



KEILA MARTHA AMORIM BARROSO

U

F

R

N

**EXPRESSÃO DE VEGF-C, VEGF-D, MENSURAÇÃO DA
DENSIDADE LINFÁTICA E DA PROLIFERAÇÃO ENDOTELIAL
LINFÁTICA EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA SALIVAR**

Natal / RN

2014

KEILA MARTHA AMORIM BARROSO

**EXPRESSÃO DE VEGF-C, VEGF-D, MENSURAÇÃO DA DENSIDADE
LINFÁTICA E DA PROLIFERAÇÃO ENDOTELIAL LINFÁTICA EM
NEOPLASIAS DE GLÂNDULA SALIVAR**

NATAL/RN

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

**EXPRESSÃO DE VEGF-C, VEGF-D, MENSURAÇÃO DA DENSIDADE
LINFÁTICA E DA PROLIFERAÇÃO ENDOTELIAL LINFÁTICA EM
NEOPLASIAS DE GLÂNDULA SALIVAR**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-graduação em Patologia Oral do
Departamento de Odontologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, como parte de
requisitos para a obtenção de Título de Doutor em
Patologia Oral

Doutoranda: Keila Martha Amorim Barroso

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lélia Batista de Souza

NATAL/RN

2014

Catlogação na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia
Biblioteca Setorial de Odontologia “Profº Alberto Moreira Campos”.

Barroso, Keila Martha Amorim.

Expressão de VEGF-C, VEGF-D, mensuração da densidade linfática e da
proliferação endotelial linfática em neoplasias de glândulas salivar / Keila Martha
Amorim Barroso. – Natal, RN, 2014.

136 p. : il.

Orientador: Profa. Dra. Lélia Batista de Souza.

Tese (Doutorado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do
Norte. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Odontologia. Programa de
Pós-Graduação em Patologia Oral.

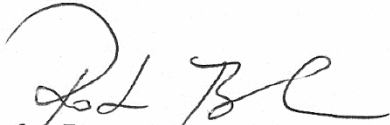
1. Linfangiogênese – Tese. 2. Glândulas Salivares – Tese. 3. Imuno-
histoquímica – Tese. 4. Patologia – Tese. I. Souza, Lélia Batista de. II. Título.

RN/UF/BSO


Black D6

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2014, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

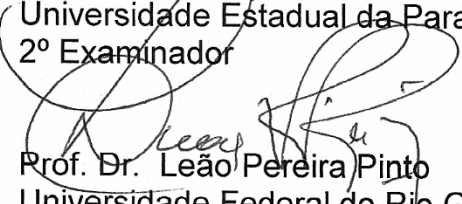
COMISSÃO EXAMINADORA



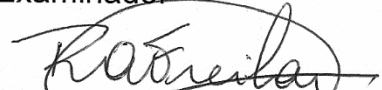
Prof. Dra. Roberta Barroso Cavalcante
Universidade de Fortaleza
1º Examinador



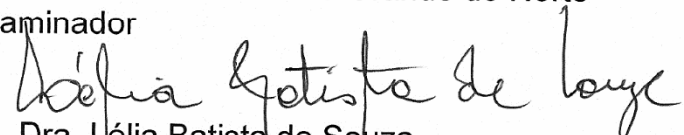
Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy
Universidade Estadual da Paraíba
2º Examinador



Prof. Dr. Leão Pereira Pinto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
3º Examinador



Prof. Dra. Roseana de Almeida Freitas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
4º Examinador



Prof. Dra. Lélia Batista de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
5º Examinador

Dedicatória

A Deus,

*A minha avó **Terezinha Amorim dos Santos**, pelo exemplo de bondade, carinho e amor.*

*A minha mãe **Maria das Graças Amorim Barroso**, pelo amor incondicional, o carinho, o apoio em qualquer situação e pelo exemplo de profissional na clínica e no ensino, o que me inspirou a escolher a odontologia e o ensino dessa arte.*

*A meu pai **José Geraldo Farias Barroso**, pelo amor incondicional e o seu carinho, pelo exemplo de profissional e pessoal de ética, profissionalismo e honestidade.*

*Aos meus irmãos **Jomario Fagner Amorim Barroso** e **Jefferson Emanuel Amorim Barroso**, que cresceram e sonharam junto comigo e me apoiaram na realização de tudo que desejei, sempre vibrando a cada conquista.*

Agradecimientos

*A **Deus** agradeço pela minha vida, por me proteger, me dar forças, guiar todos os meus passos e por todas as oportunidades que me tem dado de testemunhar o seu amor.*

*Aos meus amados pais, **Maria das Graças Amorim Barroso e José Geraldo Farias Barroso**, meus exemplos de profissionais competentes e éticos, agradeço por todo carinho, cuidado, incentivo e compreensão em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!*

*Aos meus queridos irmãos **Jomario Fagner Amorim Barroso e Jefferson Emanuel Amorim Barroso**, por todo amor e incentivo aos meu sonhos. Amo vocês!*

*À minha avó **Teresinha Amorim dos Santos**, mulher forte e doce que me enriquece a cada dia com seu exemplo de vida e doação, por todo amor e zelo. Amo você minha “vozinha”!*

*À **família Amorim** e à **família Barroso**, fui abençoada com um família carinhosa, presente, e que mesmo distante recebi o apoio e o amor de vocês. Obrigada pela torcida, por alegrarem a minha vida e pelo incentivo.*

*À minha orientadora **Profa. Dra. Lélia Batista de Souza**, por toda sua dedicação, paciência, disponibilidade e compreensão em todos os momentos. Agradeço a oportunidade de ter a sua orientação, foi uma honra receber os seu ensinamentos. Guardarei sempre comigo o seu exemplo de simplicidade, honestidade, dedicação, compromisso e entusiasmo com a vida acadêmica e com o Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral. Obrigada por tudo!*

*Ao **Prof. Dr. Leão Pereira Pinto** pela dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral. Agradeço pelo sorriso ofertado a cada encontro, sua atenção, gentileza e carinho de sempre. Obrigada pelos ensinamentos e palavras de incentivo.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral **Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas, Profa. Dra. Hébel Cavalcanti Galvão, Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz, Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa, Profa. Dra. Márica Cristina da Costa Miguel, Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira e Profa. Dra. Ana Myriam Costa de Medeiros** pelo conhecimento transmitido e contribuição para minha formação acadêmica. Agradeço a dedicação, o incentivo e o estímulo para alcançarmos o nosso melhor. Muito Obrigada!*

*À **Profa. Dra. Manoela Domingues Martins e Profa. Dra. Roberta Barroso Cavalcante** pela colaboração que permitiu a complementação da amostra deste trabalho e possibilitou a realização dos meus experimentos.*

*Ao **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy** por despertar em mim o interesse pela Patologia Oral. Agradeço as palavras de incentivo e pelo exemplo de profissional dedicado ao ensino acadêmico de qualidade.*

*Ao meus irmãos de orientação **Valéria Freitas**, pelo acolhimento, carinho, cuidado e amizade, **Pedro Paulo** pela amizade e apoio constante, **Marcelo Nascimento e Vilson Lacerda**, pela gentileza, carinho e agradável convivência.*

*Aos meus queridos amigos. À **Maíra Araújo Vilar**, crescemos e aprendemos juntas, em nossas brincadeiras, nos nossos estudos, você sempre acreditou que eu chegaria onde eu desejasse e essa sua fé em mim e sua amizade me deu forças para realizar todos os meus sonhos. A minha amiga **Januária dos Santos Lima**, e porque não dizer minha irmã escolhida pelo coração e por Deus, obrigada por seu carinho, por sua amizade, por seu apoio em cada momento da minha vida. Aos meus amigos **André Silva, Fernando Eulálio e Tércio Eulálio** pela amizade, pelo carinho e pelo apoio dedicado em todos os momentos. Vocês são uma benção na minha vida.*

*À **Betania Fachetti Ribeiro** uma irmã que Deus me deu de presente. Obrigada a você, Eduardo e Júlia por serem a minha família aqui em Natal, foi tanto carinho ofertado, tanto cuidado e preocupação constante com o meu bem estar, não tenho palavras para descrever o quanto sou grata. Bê, você me ajudou no momento mais difícil que passei até hoje em minha vida. Seu carinho, suas palavras, sua companhia foram fundamentais para eu ter conseguido ficar bem e seguir em frente com meu doutorado. Obrigada pelo presente que é Julia pra minha vida, minha sobrinha de coração. Amo vocês.*

*A **Gustavo Gomes Agripino** outro irmão que Deus me proporcionou. Obrigada por seu carinho, sua atenção e cuidado. Obrigada por todo estímulo, a sua confiança em mim me tornou mais forte e me fez acreditar que eu era capaz de realizar cada um dos meus sonhos. Obrigada por me conhecer tão bem e por traduzir em palavras, sempre sábias, o que precisava em cada momento de dúvida, de tristeza e de dificuldade. Obrigada por vibrar a cada conquista minha, é muito bom saber que conto com a sua amizade! Amo você.*

*À **Águida Cristina Gomes Henriques e Joabe dos Santos Pereira** meus tesouros encontrados em Natal. Não tenho palavras para expressar como vocês são especiais e o tamanho do meu carinho, amor e amizade por vocês. Obrigada por não deixarem eu me sentir sozinha em nenhum momento, obrigada por dividirem comigo suas alegrias e suas dores. Águida, o seu sorriso e seu entusiasmo e a sua força minha amiga, me proporcionaram alegria, força e entusiasmo. Joabe, o seu jeito divertido, sua fé em Deus, sua sabedoria e a sua companhia tornaram meus dias mais suaves, agradáveis e felizes. E que alegria foi recebermos a benção divina de realizarmos nossos sonhos profissionais e nos tornarmos professores! Estaremos em estados diferentes, mas terão sempre a minha amizade, guardarei vocês na minha mente e no meu coração!*

*À **Melka Coelho Sá** por todo o cuidado e ajuda despretensiosa. Sua companhia e amizade tornaram meus dias mais alegres, mais suaves e muito mais divertidos. Obrigada por tudo!*

*À **Denise de Oliveira** por toda gentileza e disponibilidade para realizar o escaneamento das lâminas para realização deste trabalho.*

*Aos meus colegas e amigos da turma de doutorado: **Cyntia Carvalho, Conceição Maia, Emeline Lima, Felipe Matos, Fernando Nóbrega, Joabe Pereira, e Maiara Moraes.***

*Aos demais amigos e colegas do mestrado e do doutorado com quem tive a oportunidade de conviver: **Adriana Câmara, Águida Henriques, Alessandra Barreto, Ana Rafaela Martins, Ana Luíza Andrade, Andréia do Carmo, Bárbara Monteiro, Clarissa Demeda, Denise de Oliveira, Edilmar Santos, Emília Silva, Fernanda Ginani, Jamile Oliveira, José Nazareno, Luciana Castro, Luiz Juliasse, Marcelo Nascimento, Maria Alice Leite, Maria Luíza Sousa, Melka Sá, Natália Barbosa, Roseane Vasconcelos, Rodrigo Vasconcelos, Stefânia Ferreira, Thâmara Bezerra, Thais Maciel, Tiago Filho, Vilson Lacerda, Viviane Oliveira, Dmitry Sarmiento, Lucileide de Oliveira, Marcelo Vasconcelos, Pedro Carlos, Pedro Paulo Santos, Valéria Freitas.***

Aos colegas da Unidade Acadêmica de Biologia da Universidade Federal de Campina Grande pela acolhida, incentivo e compreensão ao longo deste ano em que precisei me dividir entre os compromissos acadêmicos e a conclusão do meu doutorado.

*Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral: **Gracinha, Hévio, Idelzuíte, Lourdinha, Ricardo e Sandrinha** pela receptividade, pela disponibilidade em auxiliar, pela boa convivência e por toda a dedicação ofertada. Muito obrigada!*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.*

“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia.”

Clarice Lispector

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares exibem uma grande diversidade morfológica e comportamentos biológicos variados o que suscita o interesse na pesquisa destas lesões. A disseminação das células tumorais é um passo inicial para a progressão de neoplasias malignas e, dentro deste contexto, os vasos linfáticos neoformados são considerados essenciais para que ocorra essa disseminação. O papel do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) na formação dos vasos é fato conhecido mas, pouco se sabe a respeito de sua participação em tumores de glândula salivar. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do VEGF-C e VEGF-D, a densidade linfática tumoral (D2-40) e a proliferação endotelial linfática (dupla marcação D2-40/Ki-67) em uma série de neoplasias de glândulas salivares. A amostra foi composta por 20 adenomas pleomórficos, 20 carcinomas adenóides císticos, 20 carcinomas mucoepidermóides e 10 casos de tecido glandular salivar com características de normalidade para efeito comparativo. Todos os casos estudados exibiram expressão positiva para VEGF-C em região peritumoral e intratumoral, não sendo encontrada diferenças de imunoexpressão entre os grupos. No entanto, o grupo dos carcinomas adenóides císticos demonstrou diferença significativa da imunoexpressão do VEGF-C segundo o padrão cribriforme e sólido ($p = 0,004$). A maioria dos casos constantes do presente estudo, apresentou fraca marcação para VEGF-D em região peritumoral e intratumoral. Na avaliação da densidade endotelial linfática peritumoral, intratumoral e total, os grupos estudados revelaram um gradiente crescente, com valores menores para o grupo dos adenomas pleomórficos, seguido dos carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos. A densidade endotelial linfática foi maior entre os tumores malignos do que nos tumores benignos. Não foi observada correlação entre a imunoexpressão de VEGF-C e VEGF-D em relação a densidade linfática tumoral e a proliferação endotelial linfática.

Palavras-chave: Linfangiogênese, VEGF-C, VEGF-D, imuno-histoquímica, glândulas salivares, patologia.

Abstract

ABSTRACT

Salivary gland neoplasms exhibit a great morphological diversity and varied biological behavior which raises the interest in the study of these lesions. The spread of tumor cells is an early step in the progression of malignancies and the neoformed lymphatic vessels are considered essential in tumor dissemination. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a family of proteins involved in angiogenesis e lymphangiogenesis. However, in salivary tumors we have limited information on the expression. The aim of this study was to assess the expression of VEGF-C and VEGF-D, lymphatic vessel density (single-staining D2-40) and lymphatic endothelial proliferation (double labeling D2-40/Ki-67) in a series of salivary glands neoplasms. We selected 20 cases of pleomorphic adenoma, 20 of mucoepidermoid carcinoma, 20 of adenoid cystic carcinoma and 10 tissue sample of normal salivary gland. All cases studied showed positive expression of VEGF-C in intratumoral and peritumoral region, no differences in immunoreactivity was found between the groups. However, the group of adenoid cystic carcinoma showed a significant difference in immunoreactivity of VEGF-C by the cribriform and solid pattern ($p = 0.004$). Most of the cases included in this study showed weak immunoreactivity for VEGF-D in intratumoral and peritumoral region. In the assessment of lymphatic endothelial density peritumoral, intratumoral and total, the groups showed an increasing gradient, with lower values for the group of pleomorphic adenomas followed by mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma. Lymphatic endothelial cell density was higher in malignant than benign tumors. No correlation was observed between the immunoreactivity of VEGF-C and VEGF-D in relation to tumor lymphatic density and lymphatic endothelial proliferation.

Keywords: Lymphangiogenesis, VEGF-C, VEGF-D, immunohistochemical, salivary gland, pathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo clássico. (Pannoramic Viewer, H/E)	85
Figura 2. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo mixóide (Pannoramic Viewer, H/E)	85
Figura 3. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo celular (Pannoramic Viewer, H/E)	86
Figura 4. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de baixo grau de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E)	86
Figura 5. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E)	87
Figura 6. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de alto grau de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E)	87
Figura 7. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão tubular (Pannoramic Viewer, H/E)	88
Figura 8. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, H/E)	88
Figura 9. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão sólido (Pannoramic Viewer, H/E)	89
Figura 10. Fotomicrografia evidenciando a marcação pelo VEGF-C em glândula salivar normal (Pannoramic Viewer, Envision)	89
Figura 11. Fotomicrografia evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pleomórfico do tipo clássico (Pannoramic Viewer, Envision)	90

Figura 12. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pelomórfico do tipo mixóide (Pannoramic Viewer, Envision)	90
Figura 13. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pelomórfico do tipo celular (Pannoramic Viewer, Envision)	91
Figura 14. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau (Pannoramic Viewer, Envision)	91
Figura 15. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário (Pannoramic Viewer, Envision)	92
Figura 16. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de alto grau (Pannoramic Viewer, Envision)	92
Figura 17. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão tubular (Pannoramic Viewer, Envision)	93
Figura 18. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, Envision) .	93
Figura 19. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão sólido (Pannoramic Viewer, Envision)	94
Figura 20. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em glândula salivar normal (Pannoramic Viewer, Envision)	94
Figura 21. Fotomicrografica evidenciando a ausência de marcação para VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo clássico (Pannoramic Viewer, Envision) ...	95
Figura 22. Fotomicrografica evidenciando a ausência de marcação para VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo mixóide (Pannoramic Viewer, Envision) ...	95
Figura 23. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo celular (Pannoramic Viewer, Envision)	96

Figura 24. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau (Pannoramic Viewer, Envision)	96
Figura 25. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário (Pannoramic Viewer, Envision)	97
Figura 26. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de alto grau (Pannoramic Viewer, Envision)	97
Figura 27. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão tubular (Pannoramic Viewer, Envision)	98
Figura 28. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, Envision) .	98
Figura 29. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão sólido (Pannoramic Viewer, Envision)	99
Figura 30. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de adenoma plemórfico (Pannoramic Viewer, Envision)	99
Figura 31. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision)	100
Figura 32. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision)	100
Figura 33. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de adenoma pleomórfico (Pannoramic Viewer, Envision)	101

Figura 34. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcção pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision)	101
Figura 35. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcção pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision)	102
Figura 36. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 nos vasos linfáticos de um caso de carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain)	102
Figura 37. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 nos vasos linfáticos do adenoma pleomórfico (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain)	103
Figura 38. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 no vaso linfático do carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain)	103
Figura 39. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 no vaso linfático do carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain)	104

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS

- Quadro 1.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo 64
- Quadro 2.** Especificidade, clone e fabricante dos anticorpos primários utilizados no estudo 66

TABELAS

- Tabela 1.** Características histopatológicas, valores pontuais e pontuações utilizadas na gradação do CME de acordo com OMS, 2005 38
- Tabela 2.** Número e percentual em relação aos subtipo/gradação/padrão histopatológico de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014..... 72
- Tabela 3.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de expressão de VEGF-C em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014 73
- Tabela 4.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a expressão de VEGF-C em relação à gradação histopatológica dos carcinomas mucoepidermóides e padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014 74
- Tabela 5.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de expressão de VEGF-D em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014 75
- Tabela 6.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a expressão de VEGF-D em relação à gradação/padrão histopatológico dos carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014 76

Tabela 7. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014	78
Tabela 8. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos graus histopatológicos dos carcinomas mucoepidemóides. Natal, RN – 2014	79
Tabela 9. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014)	80
Tabela 10. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os vasos duplamente marcados com D2-40/Ki-67 em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares e glândula salivar normal. Natal, RN – 2014	81
Tabela 11. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os vasos duplamente marcados com D2-40/Ki-67 em relação ao subtipo/grau/padrão histopatológico de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.....	82
Tabela 12. Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos escores de expressão de VEGF-C nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014	83
Tabela 13. Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a densidade linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-D nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014	83
Tabela 14. Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a proliferação endotelial linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-C nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014.....	84
Tabela 15. Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a proliferação endotelial	

linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-D nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014	84
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Adenoma pleomórfico
BSA	Do inglês <i>bovine albumin serum</i> , traduzido como albumina soro bovino.
CAC	Carcinoma mucoepidermóide
CD-34	Do inglês <i>cluster of differentiation 34</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 34.
CEL	Célula endotelial linfática
CES	Célula endotelial sanguínea
CK-14	Do inglês <i>cytokeratin 14</i> , traduzido como citoqueratina 14.
CME	Carcinoma mucoepidermóide
CXAP	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
D2-40	Refere-se ao antígeno D2-40 ou ao anticorpo anti-D2-40
DLI	Densidade linfática intratumoral
DLP	Densidade linfática peritumoral
DLT	Densidade linfática total
DVL	Densidade Vascular Linfática
Flt-1	Do inglês <i>FMS-like tyrosine kinase-1</i> traduzido como receptor 1 de fator de crescimento endotelial vascular.
Flt-4	Do inglês <i>FMS-like tyrosine kinase-4</i> traduzido como receptor 4 de fator de crescimento endotelial vascular.
HRP	Do inglês <i>enzyme horseradish peroxidase</i> , traduzido como enzima peroxidase.
kDa	Do inglês <i>kilodalton</i> , traduzindo quilodálton
KDR	Do inglês <i>kinase insert domain-containing receptor</i>
Ki-67	Refere-se ao antígeno celular Ki-67 ou ao anticorpo anti-Ki-67.
LMVD	Do inglês <i>lymphatic microvessel density</i> , traduzido como densidade microvascular linfática
LYVE 1	Do inglês, <i>lymphatic vessel hyaluran receptor-1</i> , traduzido como receptor de hialurona de vasos linfáticos 1.
OMS	Organização Mundial de Saúde

PDGF	Do inglês <i>platelet-derived growth factor</i> , traduzindo como fator de crescimento derivado de plaqueta.
PLGF	Do inglês <i>placental growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento placentário.
PROX-1	Do inglês <i>prospero related homeobox gene-1</i> , traduzido como fator de transcrição homeobox.
RTK	Do inglês tyrosine kinase receptor, traduzido como receptor tirosina quinase
SISNEP	Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos.
SKY	Do inglês <i>spleen tyrosine kinase</i> , traduzido como tirosina quinase do baço.
SLP76	Do inglês <i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i> , traduzido como proteína leucocitária de 76 kDa contendo o domínio SH2.
SPSS	Do inglês <i>Statistical Package for Social Science</i> .
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
VEGF	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
VEGF-A	Refere-se a isoforma A do fator de crescimento endotelial vascular.
VEGF-B	Refere-se a isoforma B do fator de crescimento endotelial vascular.
VEGF-C	Refere-se a isoforma C do fator de crescimento endotelial vascular.
VEGF-D	Refere-se a isoforma D do fator de crescimento endotelial vascular.
VEGFR-1	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor-receptor 1</i> , traduzido como receptor 1 do fator de crescimento endotelial.
VEGFR-2	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor-receptor 2</i> , traduzido como receptor 2 do fator de crescimento endotelial.
VEGFR-3	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor-receptor 3</i> , traduzido como receptor 3 do fator de crescimento endotelial.
µl	Do inglês <i>microliter</i> traduzido como microlitro.
µm	Do inglês <i>micrometer</i> traduzido micrômetro.s
TRIS	Tris-hiroximetil-aminometano.
HE	Hematoxilina e eosina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	34
2 REVISÃO DA LITERATURA	37
2.1 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES	38
2.1.1 Considerações gerais	38
2.1.2 Adenoma pleomórfico	39
2.1.3 Carcinoma mucoepidermóide	41
2.1.4 Carcinoma adenóide cístico	43
2.2 LINFANGIOGÊNESE	47
2.2.1 Expressão do D2-40 e Ki-67 no Câncer	50
2.3 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF).....	51
2.3.1 Expressão do VEGF-C e VEGF-D no câncer	53
3 PROPOSIÇÃO	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	60
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	60
4.3 POPULAÇÃO	60
4.4 AMOSTRA.....	60
4.5 ESTUDO MORFOLÓGICO	61
4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	62
4.6.1 Método imuno-histoquímico	62
4.6.2 Análise imuno-histoquímica	67
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5 RESULTADOS	69
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	70
5.1.1 Adenoma pleomórfico	70
5.1.2 Carcinoma mucoepidermóide	71
5.1.3 Carcinoma adenóide cístico	71
5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	72
5.2.1 Análise da imunexpressão de VEGF-C e VEGF-D	72
5.2.2 Análise da imunexpressão da dupla marcação D2-40/Ki-67	77
5.2.2.1 Análise da densidade linfática	77

5.2.2.2 Análise da proliferação endotelial linfática.....	81
6 DISCUSSÃO	105
7 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE	130
ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de glândulas salivares (TGS) ainda que incomuns, compreendem uma importante área da Patologia Oral. Essas neoplasias exibem uma enorme diversidade morfológica nos diferentes tipos de tumores e, por vezes, até mesmo dentro do mesmo tipo tumoral (BARNES et al., 2005). Desta forma a ampla variedade de comportamento biológico e a grande diversidade morfológica que estes tumores apresentam, suscitam, muitas vezes, dificuldades de diagnóstico, classificação e tratamento (SPEIGHT, BARRETT, 2002; SPEIGHT, 2007).

Os tumores de glândulas salivares correspondem aproximadamente a 6,5% de todos os neoplasmas de cabeça e pescoço, sendo os tumores benignos os tipos mais frequentes, correspondendo a 54 a 79% destas doenças enquanto que os tumores malignos são responsáveis por 21 a 46% (BARNES et al., 2005). Entre os tumores benignos o adenoma pleomórfico é a neoplasia mais frequente das glândulas salivares maiores e menores (WANG et al., 2007; JONES et al., 2008), enquanto o tumor maligno mais comum é o carcinoma mucoepidermóide apresentando um potencial variado de comportamento biológico agressivo (BARNES et al., 2005; BAI et al., 2013). O carcinoma adenóide cístico é um dos tumores malignos mais comuns de glândula salivar e merece destaque devido ao seu aspecto microscópico, comportamento biológico, índice de recidiva e metástases (BIANCHI et al., 2008; COPELLI et al., 2008; SUBHASHRAJ, 2008).

A disseminação de células tumorais malignas via vasos linfáticos e suas implicações no tratamento tem sido estudada. Diferentes teorias sobre a disseminação dos tumores sólidos foram introduzidas com base em dados experimentais e na observação durante o seguimento dos pacientes (TANIS et al., 2001). A maioria dos tumores sólidos sofre metástase para os linfonodos regionais, preferencialmente, via vasos linfáticos e este é um dos primeiros sinais de disseminação do câncer nos pacientes (TOBLER; DETMAR, 2006; DAS; SKOBE, 2008) servindo como um importante indicador de prognóstico para a progressão dos cânceres humanos. Contudo, a interpretação prognóstica e funcional dos vasos linfáticos intratumorais e peritumorais ainda se mantém controversa (KAWAMURA, 2011).

Pesquisas recentes sugerem a existência de um mecanismo linfangiogênico mediado pelo fator de crescimento endotelial vascular-C (VEGF-C) e o fator de crescimento endotelial vascular-D (VEGF-D), em que novos vasos linfáticos surgem do crescimento e extensão de vasos pré-existentes (OKADA et al., 2005; SCHOPPMANN et al., 2006; SIMIANTONAKI et al., 2008).

Na literatura científica atual, pesquisas sobre linfangiogênese e as proteínas a ela associada em neoplasias malignas orais têm sido amplamente desenvolvidas (KYZAS et al., 2006; HIROTA et al., 2012; WATANABE et al., 2013). Em contrapartida, o papel dessas proteínas e da linfangiogênese em neoplasias de glândulas salivares não está esclarecido e os estudos envolvendo estas lesões são escassos (SOARES et al., 2007; SOARES et al., 2009; FUJITA et al., 2011; MELLO et al., 2011; TAMPOURIS et al., 2012; SALZMAN et al., 2014). Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar o mecanismo da linfangiogênese em uma série de neoplasias de glândulas salivares e, com isto, fornecer subsídios que auxiliem na compreensão das diferenças existentes no comportamento biológico dos adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

2.1.1 Considerações gerais

As neoplasias de glândulas salivares são um dos grupos mais complexos e relativamente raros de lesões encontradas na prática da patologia oral (BARNES et al., 2005; DWIVEDI et al., 2013). A complexidade desses tumores é atribuída à heterogeneidade das células de origem destas lesões, combinada à capacidade destas células em diferenciar-se e modificar-se em vários subtipos morfológicos, os quais resultam em diversos padrões histomorfológicos. Estes aspectos peculiares levam a uma frequente sobreposição de características microscópicas que podem ser verificadas entre várias neoplasias, e às vezes até entre lesões benignas e malignas, causando por vezes um dilema diagnóstico importante. Essas características associadas com a infrequência no número de tumores dificulta muitas vezes o seu diagnóstico (BARNES et al., 2005; De OLIVEIRA, 2012; DWIVEDI et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial (OMS) as neoplasias de glândula salivar compreendem 2% a 6,5% dos tumores de cabeça e pescoço (BARNES et al., 2005; ELLIS, AUCLAIR, 2008) e a maioria dos estudos relatados na literatura incluem tumores afetando as glândulas salivares maiores e menores (ITO et al., 2005; PIRES et al., 2007). A glândula parótida tem se mostrado como o sítio de maior acometimento em cerca de 60% a 80% dos casos, 7% a 11% dos casos ocorrem nas glândulas submandibulares, menos de 1% ocorrem nas glândulas sublinguais e entre 9% e 23% dos casos acometem as glândulas salivares menores (BARNES et al. 2005).

As neoplasias de glândula salivar são mais incidentes em indivíduos do sexo feminino, sendo os tumores benignos os mais prevalentes. O adenoma pleomórfico é uma neoplasia benigna, sendo esta a mais frequente de glândula salivar maior e menor. O carcinoma mucoepidermóide é a neoplasia maligna mais frequente, com cerca de metade dos casos acometendo as glândulas salivares maiores, seguida pelo carcinoma adenóide cístico que engloba aproximadamente 10% de todas as neoplasias de glândula salivar (BARNES et al., 2005; ITO et al., 2005; PIRES et al., 2007; JONES et al., 2008).

2.1.2 Adenoma Pleomórfico

O adenoma pleomórfico é uma neoplasia epitelial benigna, sendo a mais frequente das glândulas salivares maiores e menores (EVESON et al., 2005; ITO et al., 2005; JABER et al., 2006; AL-KHATEEB, ABABNEH, 2007; ANSARI, 2007; BUCHNER et al., 2007; PIRES et al., 2007; WANG et al., 2007; JONES et al., 2008). Engloba 70% de todas as neoplasias de glândula salivar e acomete indivíduos entre a quarta e a sexta década de vida, com idade média de 46 anos, apresentando uma discreta predileção pelo sexo feminino. A maioria dos casos ocorre na glândula parótida e quando acometem as glândulas salivares menores, o palato é a localização mais frequente, seguido pelo lábio superior e mucosa jugal (EVESON et al., 2005; AL-KHATEEB, ABABNEH, 2007; BUCHNER et al., 2007; PIRES et al., 2007).

Os adenomas pleomórficos da região do palato geralmente são unilaterais e situam-se lateralmente à linha média. Como os tumores do palato estão confinados na mucosa e esta se encontra fortemente aderida ao osso palatal, a mobilidade destes tumores é bem limitada nesta localização. Adenomas pleomórficos em outras localizações, como no lábio superior ou mucosa jugal, são móveis e cobertos por mucosa normal, a menos que sejam traumatizados (ELLIS, AUCLAIR, 2008; NEVILLE et al., 2009; SAHOO; RANGAN; GADAD, 2013).

A maioria dos adenomas pleomórficos da glândula parótida acomete o polo inferior do lobo superficial da glândula, apresentando-se como uma tumefação sobre o ramo mandibular à frente da orelha (ELLIS, AUCLAIR, 2008; NEVILLE et al., 2009). São tipicamente de crescimento lento e indolor que se apresentam como massas discretas, móveis e de consistência firme, mas que podem atingir grandes dimensões quando não tratados e tendem a formar massa nodular irregular, elevando a pele ou mucosa suprajacente (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008; NEVILLE et al., 2009; SAHOO; RANGAN; GADAD, 2013).

Quanto ao seu aspecto macroscópico, os adenomas pleomórficos tendem a formar tumores nodulares, redondos ou ovóides com bordos bem definidos. Conforme comentado por Everson et al. (2005) e Ellis, Auclair, (2008), normalmente, o adenoma pleomórfico é circunscrito e encapsulado, embora essa cápsula possa ser incompleta ou mostrar infiltração pelas células tumorais, principalmente nos tumores de glândula salivar menor (MĂRGĂRITESCU et al., 2005). A infiltração capsular focal por células tumorais é muito comum (DARDICK 1996; EVESON et al., 2005) e foi observada em 80% dos 218 casos de adenomas pleomórficos de glândula parótida estudados por Zbären e Stauffer (2007).

Histopatologicamente, o adenoma pleomórfico é composto de células epiteliais e mioepiteliais que se arranjam em ninhos, cordões, lençóis celulares e estruturas ductiformes

que se organizam em diversos padrões, conferindo ao tumor uma ampla diversidade citomorfológica e arquitetural (DARDICK, 1996; AUCLAIR, ELLIS, 1996; EVESON et al., 2005; MĂRGĂRITESCU et al., 2005; ITO et al., 2009). As células mioepiteliais tendem a ser o elemento predominante, superando numericamente as epiteliais, estas podem assumir um formato cuboidal, basalóide, fusiforme, plasmocitóide, escamoso e ocasionalmente de células claras. Raramente células mucosas e sebáceas são evidenciadas (EVESON et al., 2005; MĂRGĂRITESCU et al., 2005; ITO et al., 2009). Ito et al. (2009), analisando as características histopatológicas de 189 casos de adenomas pleomórficos, concluíram que as células plasmocitóides eram o tipo celular mais frequente nestes tumores, seguido das células fusiformes e cuboidais.

O componente estromal do adenoma pleomórfico é bastante variável podendo apresentar áreas mixóides, hialinas, fibrosas, condróides, condromixóides e mais raramente tecido ósseo e adiposo. Eventualmente, o material condróide pode representar a maior área do tumor e o desenvolvimento de estroma mixocondróide é uma característica estromal patognomônica do adenoma pleomórfico (MORINAGA et al., 1987; TAKAI et al., 1994; MĂRGĂRITESCU et al., 2005). Em meio à proliferação de células tumorais mioepiteliais, podem ser evidenciadas áreas de diferenciação escamosa e mais raramente adiposa e óssea. As zonas cartilaginosas resultam do acúmulo de material mixo-hialino em torno de células individuais e apenas raramente se assemelham à cartilagem hialina madura. Geralmente, os espaços presentes em áreas condróides apresentam um ou dois núcleos. (MORINAGA et al., 1987; TAKAI et al., 1994; MĂRGĂRITESCU et al., 2005; FREITAS et al., 2011).

A presença de epitélio escamoso também pode ser evidenciada nos adenomas pleomórficos, podendo ser difuso e com formação de espaços císticos preenchidos por ceratina. Além disso, ainda podem ser observados, em alguns tumores, depósitos de material homogêneo, hialino e eosinofílico entre as células tumorais e no estroma, bem como a presença de material cristalóide (ELLIS, AUCLAIR, 1996; EVESON et al., 2005; MĂRGĂRITESCU et al., 2005), composto por substância colagênica, tirosina e oxalato, sendo mais comum nos adenomas pleomórficos do que em qualquer outra neoplasia de glândula salivar (MĂRGĂRITESCU et al., 2005).

Os adenomas pleomórficos foram classificados histologicamente por Seifert et al. (1976) em 4 tipos com base na diferenciação das células epiteliais e mioepiteliais e na quantidade e natureza do estroma. O tipo I, conhecido como clássico, apresenta uma quantidade equilibrada entre as células epiteliais e o componente estromal, contendo 30-50% de estroma. No tipo II ou mixóide (rico em estroma), 80% do tumor corresponde a estroma

predominantemente mixóide. O tipo III, chamado de celular (rico em células), apresenta uma quantidade menor ou igual a 20-50% de estroma. O tipo IV revela um estroma em proporções semelhantes ao tipo III, mas apresenta uma diferenciação monomórfica focal no componente epitelial.

O tratamento de escolha é a excisão cirúrgica. Para os adenomas pleomórficos de glândulas submandibulares é recomendada a remoção completa da glândula, para as glândulas salivares menores é a excisão cirúrgica com remoção de pequena porção de tecido circundante, sendo raras as recidivas nestas duas localizações. Quando a lesão acomete as glândulas parótidas recomenda-se a parotidectomia parcial ou a superficial total com preservação do nervo facial (EVESON et al., 2005; MENDENHALL et al., 2008).

Apesar deste tumor, geralmente, apresentar um curso clínico indolente e bom prognóstico, recomenda-se a preservação prolongada do paciente, uma vez que casos de recorrência e transformação maligna têm sido relatados. Quando esta transformação acontece, a lesão passa a ser denominada de carcinoma ex-adenoma pleomórfico que, na maioria das vezes, exibe um comportamento agressivo com desenvolvimento de metástases regionais e distantes para pulmões, ossos e vísceras (EVESON et al., 2005; SOARES et al., 2007)

2.1.3 Carcinoma Mucoepidermóide

O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum em glândulas salivares e é caracterizado por uma grande variabilidade em seu comportamento clínico (BARNES et al., 2005; GLEBER-NETTO et al., 2012; BAI et al., 2013). As glândulas salivares maiores estão envolvidas em 54,6% dos casos, predominando a glândula parótida. Podem acometer também outros tecidos glandulares como as glândulas de revestimento dos seios maxilares, glândulas lacrimais, orofaringe, nasofaringe, laringe, pregas vocais, traqueia e pulmões (ZINI et al., 2010).

O carcinoma mucoepidermóide pode ocorrer tanto em adultos quanto em crianças (BARNES et al., 2005; GOODE, EL-NAGGAR, 2005). A idade média dos pacientes é de aproximadamente 45 anos (BARNES et al., 2005). O tumor manifesta-se de forma assintomática, com evolução rápida, se apresentando como um aumento de volume, principalmente na região de palato, por vezes flutuante, de consistência firme e indolor, podendo exibir coloração azul ou avermelhada, assemelhando-se clinicamente com o mucocele (BARNES et al., 2005; NEVILLE et al., 2009).

Histopatologicamente, o carcinoma mucoepidermóide caracteriza-se pela diferenciação de três tipos celulares básicos: as células mucosas, epidermóides e intermediárias que se arranjam em proporções variadas e assumem configuração arquitetural diversa, podendo formar ninhos sólidos ou estruturas císticas. De acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os carcinomas mucoepidermóides são classificados como de baixo, médio ou de alto grau baseado em cinco aspectos histopatológicos: a presença de um componente cístico, invasão neural, necrose, atividade mitótica e anaplasia (BARNES et al., 2005). Ao mesmo tempo são atribuídas pontuações para cada um destes parâmetros. De acordo com estas características e a soma de suas respectivas pontuações, os carcinomas mucoepidermóides dividem-se em baixo, intermediário e alto grau de malignidade (Tabela 1) (OMS, 2005)

Usualmente são multicísticos, com componente sólido e, por vezes, predominância desse último. Os espaços císticos são revestidos por células mucosas, células intermediárias basalóides ou cuboidais, e em menor grau, células epidermóides poligonais exibindo rara ceratinização. As células mucosas são grandes, com citoplasma pálido e núcleo periférico deslocado e seu conteúdo é demonstrado com coloração por mucicarmim ou Alcian Blue. As células epidermóides exibem citoplasma eosinofílico abundante, com morfologia variando de arredondada a oval, por vezes assumindo um formato alongado poligonal e em outras áreas podem se mostrar como células escamosas maduras. As células intermediárias por sua vez podem variar em aparência e tamanho, desde pequenas, por vezes de aspecto basalóide até uma aparência epidermóide (BARNES et al., 2005; ELLIS, AUCLAIR, 2008).

Os carcinomas mucoepidermóides de baixo grau exibem formação de espaços císticos abundantes revestidos predominantemente por células mucosas com áreas associadas às células intermediárias e recebem escore de pontuação até 4. Os de grau intermediário exibem uma menor frequência na formação de espaços císticos associadas às células intermediárias e epidermóides, recebendo escore de pontuação de 5-6. Por fim, os de alto grau exibem predomínio de células epidermóides além de células mucosas arranjadas em um padrão sólido, com escassas formações císticas recebendo escores de pontuação igual ou superior a 7 (GOODE, EL-NAGGAR, 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008).

O tratamento de escolha é essencialmente cirúrgico, recomendando-se a excisão da lesão com margem de segurança, podendo ainda ser associado o esvaziamento dos linfonodos regionais em caso de metástases para estas estruturas (GOODE, EL-NAGGAR, 2005; ZINI et al., 2010). A associação a outras modalidades terapêuticas, como a radioterapia, pode auxiliar

no tratamento, principalmente nos tumores classificados como de alto grau de malignidade (GOODE, EL-NAGGAR, 2005).

O prognóstico dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide é influenciado pelo estágio clínico e grau histopatológico (Da SILVEIRA et al., 2006), no qual os pacientes com tumores de alto grau apresentam taxa de recorrência e metástase maior, comprometendo assim a sobrevida do paciente (BARNES et al., 2005; SIRIVANICHSUNTORN et al., 2013). Além disso, tem sido sugerido que o grau histopatológico do carcinoma mucoepidermóide pode influenciar consideravelmente o resultado do tratamento (SIRIVANICHSUNTORN et al., 2013).

Tabela 1. Características histopatológicas, valores pontuais e pontuações utilizadas na gradação do CME de acordo com OMS, 2005.

Característica histopatológicas	Pontuação
Componente cístico < 20%	+2
Invasão neural	+2
Necrose	+3
Mitoses (4 ou + por 10 campos em grande aumento)	+3
Anaplasia	+4
Gradação Tumoral	Pontuação
Baixa	0 - 4
Intermediária	5 - 6
Alta	7 ou mais

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2005.

2.1.4 Carcinoma Adenóide Cístico

O carcinoma adenóide cístico é um dos tumores malignos mais frequentes de glândula salivar (Al-KHATEEB, ABABNEH, 2007; WANG et al., 2007; COPELLI et al., 2008; SUBHASHRAJ, 2008). Origina-se das células ductais e mioepiteliais provenientes dos ductos intercalares (ALVES et al., 2004) e compreende cerca de 20% de todas as neoplasias malignas de glândula salivar, merecendo destaque devido ao seu aspecto microscópico, comportamento

biológico, índice de recidiva e disseminação sistêmica (Da CRUZ PEREZ et al., 2006; BIANCHI et al., 2008; FREITAS, 2011).

Este tumor localiza-se de forma preferencial nas glândulas parótidas, nas submandibulares e nas glândulas salivares menores, sendo raro nas glândulas sublinguais. Apresenta elevada prevalência dentre os adultos com pico de incidência entre a quarta e sexta década de vida e não exibe aparente predileção por sexo (ALVES et al., 2004; BARNES et al., 2005). A média de idade dos pacientes com esse tipo de câncer é de 45 anos e os locais mais frequentes de acometimento do tumor envolvem o palato, a mucosa jugal e a região alveolar (ALVES et al., 2004; BARNES et al., 2005; da CRUZ PEREZ et al., 2006; ELLIS, AUCLAIR, 2008).

Clinicamente, o carcinoma adenóide cístico apresenta-se como um aumento de volume ou nódulo de consistência endurecida, assintomático, recoberto por mucosa íntegra, de consistência endurecida, geralmente de crescimento lento e indolor. Contudo, a sintomatologia dolorosa pode estar presente pelo fato do tumor ser infiltrativo nos tecidos e realiza invasão perineural e, em alguns casos, intraneural. (ALVES et al., 2004; KOKEMUELLER et al., 2004; FREITAS, 2011; de OLIVEIRA, 2012). A ulceração é rara nas lesões de glândulas salivares maiores e nas neoplasias de palato, sendo possível observar superfície ulcerada e, radiograficamente, a destruição óssea (ALVES et al., 2004).

Histopatologicamente, caracteriza-se pela proliferação de dois tipos celulares principais: células epiteliais e mioepiteliais diferenciadas que mostram núcleos angulados hipercromáticos e, por vezes, citoplasma claro. Estas células encontram-se dispostas em configurações morfológicas variadas e exibem três padrões morfológicos classificados em tubular, cribriforme e sólido (BARNES et al. 2005; MARQUES, 2010).

O padrão cribriforme é o mais frequente e o sólido o mais raro, no entanto a mistura de padrões, em uma única lesão, representa uma característica comum desta neoplasia. O tipo de padrão predominante tem influência no comportamento e prognóstico da neoplasia (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, GOODE, ELLIS, 2008; MOSKALUK, 2013).

O padrão cribriforme é caracterizado pela aparência de queijo suíço, com células neoplásicas formando ilhas contendo estruturas pseudocísticas pequenas e circulares de diferentes tamanhos. Os pseudocistos, geralmente, contêm material amorfo, basofílico ou eosinofílico nos seus interiores. As células tumorais são pequenas e cubóides, exibindo núcleos profundamente basofílicos, formatos variados e citoplasma escasso (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008; MOSKALUK, 2013).

O padrão tubular também é composto pelos dois tipos celulares (ductais e mioepiteliais), porém as células com diferenciação tubular são mais facilmente discerníveis. Muitos tumores com este padrão apresentam um lúmen formado por estas células ductais, as quais são circundadas por células com diferenciação mioepitelial. As células mioepiteliais geralmente apresentam-se com núcleo angulado e citoplasma claro. As células neoplásicas encontram-se arranjadas em ilhas, as quais são separadas umas das outras por um estroma que pode mostrar-se fibroso, hialinizado e, por vezes, confere à lesão um padrão, que alguns chamam de “trabecular” (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008; MOSKALUK, 2013).

O padrão sólido é caracterizado pela proliferação de células na forma de lençóis, com pouca ou nenhuma evidência de espaços semelhantes a cistos. Individualmente, as células são semelhantes ao padrão cribriforme e tubular, porém apresentam núcleos maiores e menos angulados. O tipo celular predominante é o mioepitelial basalóide mas, focos de células com diferenciação ductal também podem ser vistas. As figuras de mitose, que não são comuns nos outros dois padrões, neste tornam-se evidentes. Pleomorfismo celular e necrose também são mais frequentemente identificados (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008; MOSKALUK, 2013).

A tendência a invasão perineural nesta neoplasia é bastante conhecida mas, não representa um fator patognomônico desta lesão, uma vez que pode ser observada também no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, dentre outros. A invasão neural, geralmente acomete a bainha do nervo porém, a invasão propriamente do nervo também é observada em algumas lesões. Diferente dos outros tumores de glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico tem a propriedade de se infiltrar no nervo além das margens do tumor. Esta característica explica, em parte, as altas taxas de recorrência desta lesão e a sintomatologia dolorosa, por vezes relatada pelos pacientes (BARNES et al., 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008).

A natureza infiltrativa do carcinoma adenóide cístico é responsável pela característica tumoral de disseminação local recorrente, a qual pode ocorrer anos após o tratamento cirúrgico e a radioterapia inicial. Metástase à distância é comum, particularmente tardia, sendo o pulmão o sítio mais comumente afetado, seguido de ossos, fígado e cérebro (ALVES et al., 2004).

De acordo com os padrões morfológicos anteriormente descritos, os carcinomas adenoides císticos têm sido divididos em três níveis de gradação histopatológica que estão associadas ao prognóstico da lesão. O grau I corresponde aos tumores que exibem padrão predominantemente tubular, com áreas cribriformes, e geralmente possuem comportamento menos agressivo e bom prognóstico. O grau II exhibe predominantemente o padrão cribriforme,

com áreas tubulares e algumas áreas sólidas dispersas. O grau III caracteriza-se pelo predomínio do padrão sólido e geralmente são mais agressivos, com prognóstico reservado (EL-NAGGAR; HUVOS, 2005).

O tratamento de escolha para o carcinoma adenoide cístico é a ressecção total e o valor de outras modalidades de terapias adjuvantes permanece controverso. A modalidade terapêutica varia de acordo com o estágio do tumor, sendo a cirurgia e radioterapia pós-cirúrgica os métodos mais frequentemente utilizados, seguido de apenas cirurgia (BRADLEY, 2004; TRIANTAFILLIDOU et al., 2006; FREITAS, 2011). Mesmo com o controle local da doença conseguido com a terapia combinada, as metástases à distância são pobremente controladas e representam a maior causa de insucesso no tratamento (MENDENHALL et al., 2004)

O índice de recorrência local do carcinoma adenóide cístico é aproximadamente 15 a 85% em estudos incluindo grandes séries de casos. Os achados patológicos associados a maior índice de recorrência são: margens ressecadas positivas, localização, grau de malignidade da lesão, invasão perineural e a presença de componentes neoplásicos com padrão sólido. A incidência de metástase a distância varia de 35% a 50% em média, em acompanhamentos de 15 a 20 anos. A metástase acomete com mais frequência os pulmões, porém alguns autores sugerem que este dado pode estar sendo subestimado em relação aos órgãos afetados pela lesão, pois uma vez detectada a metástase pulmonar, nenhuma investigação adicional é realizada. Os pacientes devem ser acompanhados por longo período de tempo, pois a recorrência e metástases podem ocorrer num longo período após tratamento (SPIRO, 1997; BRADLEY, 2004; KOKEMUELLER et al., 2004; BARNES et al., 2005; TINCANI et al., 2006).

Uma observação clínica comum é que os carcinomas disseminam-se inicialmente através do sistema linfático, enquanto os sarcomas disseminam-se pela via hematogênica. O carcinoma adenóide cístico apresenta um comportamento biológico agressivo e sofre, preferencialmente, metástase a distância, especialmente para o pulmão e raramente metastatizam para linfonodos (BARNES et al., 2005; REGEZI; SCIUBA; JORDAN, 2008)

A sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 35%, porém em longo prazo esta taxa cai para o equivalente a 20% dos casos. Oitenta a 90% dos pacientes morrem em decorrência da lesão em 10 a 15 anos resultado da disseminação sistêmica do tumor (BARNES et al., 2005; ELLIS; AULCLAIR, 2008; MOSKALUK, 2013).

2.2 LINFANGIOGÊNESE

O sistema linfático, também chamado o segundo sistema vascular, desempenha um papel crítico na homeostasia dos tecidos e na imunovigilância (HARVEY; OLIVER, 2004; OLIVER; ALITALO, 2005; TAMMELA; ALITALO, 2010; SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011). Todos os vertebrados possuem um sistema linfático, mas, com diferentes complexidades (BUTLER et al., 2009).

Em mamíferos, dois sistemas vasculares especializados são responsáveis pela circulação efetiva: a vasculatura sanguínea, a qual leva oxigênio e nutrientes e a vasculatura linfática, que transporta fluido e macromoléculas dos tecidos para a circulação sanguínea (WANG; OLIVER, 2010). Entretanto, os vasos linfáticos são distintos dos sanguíneos tanto na sua estrutura como na sua função. Estes vasos apresentam paredes mais finas, com a luz mais ampla e geralmente colapsada em condições de baixa pressão intersticial (LEAK, 1976; ALBRECHT; CHRISTOFORI, 2011).

A rede vascular linfática consiste de pequenos capilares de fundo cego, são fechados e suas extremidades apresentam-se ligeiramente dilatadas sob a forma de pequenos bulbos e amplos vasos linfáticos coletores. Os capilares linfáticos são compostos por uma única camada de células endoteliais sobrepostas e carecem de uma membrana basal contínua e pericitos. Portanto, os capilares linfáticos são altamente permeáveis ao fluido intersticial e macromoléculas, de tal modo que, quando a pressão intersticial sofre alterações, estes linfáticos expandem e são preenchidos com linfa ou contraem e empurram a linfa (LEAK; BURKE, 1966; WANG; OLIVER, 2010).

Os vasos linfáticos são encontrados em todos os órgãos e tecidos vascularizados, com a exceção do cérebro e da retina em que a drenagem de fluido intersticial ocorre perivascular ou através de uma rede venosa (ALBRECHT; CHRISTOFORI, 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário a vasculatura sanguínea é gerada através de dois processos distintos conhecidos como vasculogênese e angiogênese (RISAU; FLAMME, 1995; FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997). A vasculatura linfática é formada pelas células endoteliais linfáticas (CEL), que são altamente relacionadas com as células endoteliais sanguíneas (CES). Uma vez que o sistema linfático se origina das veias embrionárias, sua morfogênese envolve a aquisição da identidade de CEL pelas CES e posterior separação da rede de vasos sanguíneos (ALITALO; CARMELIET, 2002; ADAMS; ALITALO, 2007). Logo, as CELs adquirem seu perfil de expressão de genes especializados progressivamente durante a formação da rede linfática e, apesar de as células sanguíneas ganharem características de CELs,

elas representam duas populações celulares distintas (PETROVA et al., 2002; PODGRABINSKA et al., 2002; HIRAKAWA et al., 2003; NELSON et al., 2007; WICK et al., 2007).

Através de mecanismos ainda não completamente esclarecidos, um subconjunto de células endoteliais venosas é selecionado para constituir o primeiro brotamento de CELs. Nesta etapa, as células endoteliais começam a expressar o fator de transcrição homeobox 1 (PROX-1), LYVE 1 e VEGFR-3, proteínas reconhecidas atualmente como participantes no desenvolvimento e função dos vasos linfáticos (JACKSON et al., 2001; VEIKKOLA et al., 2001; WIGLE et al., 2002). Estimuladas pelo VEGF-C, que é secretado pelo tecido adjacente, elas migram e proliferam para formar sacos linfáticos primários, a partir dos quais os vasos linfáticos começam a germinar. Posteriormente, o plexo vascular linfático primário se separa dos vasos sanguíneos através da atuação da tirosina quinase SYK e da proteína adaptadora SLP76. Ele sofre remodelação e maturação para criar a vasculatura linfática constituída por uma rede capilar linfática, sem pericitos e membrana basal e de vasos linfáticos coletores, que contêm válvulas e estão associados com células musculares lisas, recobertos por membrana basal (BALUK et al., 2007; KARPANEN; ALITALO, 2008).

O sistema vascular linfático é uma estrutura dinâmica que responde a mudanças ambientais e evolui durante a vida do indivíduo. Nos adultos, muitas condições patológicas afetam os vasos linfáticos e eles respondem passando por neo-linfangiogênese. Tais acontecimentos incluem a inflamação e as respostas imunes, a tumorigênese como também após trauma, infecções, cirurgia e radioterapia. Muitos dos reguladores conhecidos do desenvolvimento da linfangiogênese também têm sido implicados na neo-linfangiogênese e condições patológicas (MABY-EL HAJJAMI et al, 2008).

A metástase do tumor para os linfonodos regionais muitas vezes representa o primeiro passo de disseminação do tumor e serve como um importante indicador de prognóstico para a progressão dos cânceres humanos. Uma variedade de mecanismos pode contribuir para a disseminação das células malignas de cânceres primários: a invasão de tecido local, metástase sistêmica para órgãos distantes através de vasos sanguíneos associados ao tumor, e metástase linfática para linfonodos sentinela através de vasos linfáticos associados ao tumor, gânglios linfáticos distantes e de lá para órgãos distantes. Esta última constitui a via mais comum de metástase inicial para diversos tipos de tumores sólidos humanos (STACKER et al. 2002; MABY-EL HAJJAMI et al., 2008).

Até recentemente, a identificação de vasos linfáticos era dificultada pela falta de marcadores específicos das CEL. Com a descoberta de proteínas especificamente expressas por

CEL, pesquisas em linfangiogênese e homeostase dos vasos linfáticos e sua função têm progredido de forma impressionante (ALBRECHT; CHRISTOFORI, 2011).

Um destes marcadores, específico para o endotélio linfático e que vem sendo utilizado para a avaliação da densidade vascular linfática nos tumores, é o anticorpo anti-podoplanina. A podoplanina humana consiste em uma glicoproteína transmembrana de 38kDa, constituída por 162 aminoácidos, sendo que nove deles compõem o domínio intracelular (WICKI; CHRISTOFORI, 2007; GLEBER-NETTO et al., 2012). Ela é um gene-alvo do homeobox PROX1, um gene mestre que controla o desenvolvimento de células progenitoras linfáticas a partir de veias embrionárias (SCHACHT et al., 2005; TERVALA; SUOMINEN; SAARISTO, 2008).

O nome podoplanina foi dado por Breiteneder-Geleff e colaboradores, em 1997, ao identificarem que a baixa expressão desta molécula poderia estar associada a uma nefropatia, cuja principal característica é o achatamento ou planificação de células epiteliais glomerulares, os podócitos renais (BREITENEDER-GELEFF et al., 1999; SCHACHT et al., 2005; ORDÓÑEZ, 2006). Destas observações, foi levantada a hipótese de que o antígeno M2A, reconhecido pelo anticorpo D2-40, poderia ser idêntico à podoplanina humana. Tal hipótese foi confirmada por estudos de Western blotting e Elisa, concluindo que o D2-40 é um anticorpo específico contra a podoplanina humana (SCHACHT et al., 2005).

Existem proteínas homólogas a podoplanina e, dentre elas, destaca-se a M2A, uma sialoglicoproteína de 40kDa localizada nas células endoteliais linfáticas, que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40 (SCHACHT et al., 2005; DUMOFF et al., 2006; ZHAO et al., 2008). O anticorpo D2-40, disponível comercialmente, detecta tanto a M2A quanto a podoplanina mesmo em tecidos humanos emblocados em parafina, que também constitui uma ferramenta promissora para estudos mais generalizados da linfangiogênese tumoral e seu papel na progressão do câncer humano (SCHACHT et al., 2005; DUMOFF et al., 2006).

O método de escolha para avaliação da expressão da podoplanina tem sido a técnica imuno-histoquímica, baseada na utilização de anticorpos específicos contra a podoplanina, como o anticorpo D2-40, que reage com o antígeno oncofetal M2A de membrana (LEVIDIOTIS et al., 2005). O procedimento para avaliação da atividade linfangiogênica em espécimes de blocos parafinados oriundos de biópsias, é a determinação imuno-histoquímica do número de vasos linfáticos (índice linfangiogênico), através da técnica de densidade microvascular linfática (LMVD) (VAN DER AUWERA et al., 2006).

Em relação à utilidade do D2-40 como ferramenta diagnóstica, vale ressaltar que ao contrário da maioria dos marcadores endoteliais utilizados na rotina da patologia, que também

são expressos em vasos sanguíneos, a podoplanina é uma proteína seletivamente expressa no endotélio linfático, sendo marcador útil para determinar invasão linfática tumoral (KAHN et al., 2002; DADRAS et al., 2003; CHOI et al., 2005; SCHMID et al., 2005) e para demonstrar a diferenciação linfática de tumores vasculares benignos e malignos (BREITENEDER-GELEFF et al., 1999; KAHN et al., 2002; ORDÓÑEZ, 2005).

Desde então, estudos imuno-histoquímicos com este anticorpo têm encontrado associação entre linfangiogênese tumoral, principalmente relacionada à LMVD, e estágios de progressão, metástase e pior prognóstico em várias neoplasias incluindo as de cólon, estômago, câncer de mama e de cabeça e pescoço (FOGT et al., 2004; ARIGAMI et al., 2005; CHOI et al., 2005; XUAN et al., 2005).

2.2.1 Expressão do D2-40 e Ki-67 no Câncer

A metástase linfática é causa frequente de resultados clínicos adversos em muitas neoplasias de origem epitelial, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Os mecanismos básicos envolvidos na capacidade das neoplasias epiteliais de desenvolverem metástases através dos vasos linfáticos ainda não foram completamente elucidados. Há debates sobre se as células neoplásicas podem sofrer metástase pela expansão e invasão de vasos linfáticos peritumorais pré-existentes ou pela formação e invasão de novos vasos linfáticos dentro dos tumores (linfangiogênese) (WANG; OLIVER, 2010; FUJITA et al. 2011).

Kyzas et al. (2005) analisaram 81 amostras de tecido de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, com marcação simples para podoplanina e avaliaram a densidade linfática intratumoral e peritumoral, além da dupla marcação utilizando podoplanina e o marcador de proliferação celular Ki-67, a fim de avaliar a linfangiogênese. Este estudo evidenciou uma elevada densidade linfática intratumoral e peritumoral e ambos estavam significativamente associados com a presença de metástase ganglionar no momento do diagnóstico, assim como uma significativa correlação entre a alta densidade linfática intratumoral e invasão linfática. A dupla marcação revelou a existência de proliferação de vasos linfáticos intratumorais, em que a embolia por células tumorais foi observada ocasionalmente. Os resultados do estudo indicaram que havia a ocorrência de linfangiogênese em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, e que os vasos recém-formados foram alvo de invasão pelas células malignas, e concluíram que a densidade linfática intratumoral pode ser utilizada como um critério para separar os pacientes com maior risco de um resultado clínico adverso.

Soares et al. (2007) utilizaram a marcação simples para D2-40 e duplas marcações D2-40/CK14, D2-40/CD-34 e D2-40/Ki-67 para avaliar a densidade vascular linfática (DVL) e a proliferação endotelial de vasos linfáticos em uma série de casos de carcinomas ex-adenoma pleomórfico (CXAP) em diferentes estágios da doença e em casos de adenomas pleomórficos. Ao compararem as margens tumorais de CXAP's em estágios iniciais (minimamente invasivos) e avançados (francamente invasivos), a DVL não apresentou diferença significativa. Em contraste, ao avaliarem os vasos linfáticos intratumorais em casos de adenomas pleomórficos sem transformação maligna e os casos de CXAP's em estágios iniciais continham raros vasos linfáticos, por vezes nenhum, enquanto que em CXAP's invasivos estes eram amplamente mais numerosos. No entanto, nem a DVL intratumoral nem a peritumoral estavam aumentadas, em comparação com o tecido da glândula salivar normal adjacente. Em nenhum dos casos em que foi utilizada a dupla marcação usando D2-40 e o marcador de proliferação celular Ki-67 observou-se a existência de proliferação linfática. Apenas êmbolos carcinomatosos foram encontrados em vasos linfáticos peritumorais e intratumorais apenas em CXAP's em estágios avançados sem diferenciação mioepitelial.

Gleber-Netto et al. (2012) estudaram a neo-angiogênese e a neo-linfangiogênese em carcinomas mucoepidermóides de glândula salivar menor, mensurando os vasos sanguíneos neo-formados e a densidade vascular linfática, utilizando o anticorpo CD-105 e o anticorpo D2-40, respectivamente, além da avaliação imuno-histoquímica das proteínas VEGF-A e VEGF-C. Os 26 casos de carcinoma mucoepidermóide estudados mostraram grande atividade angiogênica demonstrada pela mensuração da densidade de vasos neo-formados, entretanto, uma baixa densidade vascular linfática foi observada. O VEGF-A, VEGF-C e o D2-40 foram comumente detectados mas, apenas o VEGF-A expressou correlação com a densidade de vasos neoformados.

2.3 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

Os membros da família do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em mamíferos são: o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). Estas glicoproteínas pertencem a uma superfamília que incluem os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF). Os VEGFs são secretados como proteínas homodiméricas ligadas covalentemente e estabilizadas por pontes dissulfeto intra e inter-cadeias (POTGENS et al., 1994; MULLER et al., 1997). Estas glicoproteínas se ligam com

diferentes especificidades aos seus receptores (LOHELA et al., 2009), em um padrão que se sobrepõe, a três diferentes, mas estruturalmente relacionados, receptores tirosina quinase (RTK): VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) e VEGFR-3 (Flt-4). O VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor) é fundamental para o desenvolvimento das células hematopoiéticas e se liga aos VEGF-A, VEGF-B e PLGF (PEPPER et al., 2001; YAMASAKI; MORITA, 2006; HOLMES et al., 2008). O VEGFR-2 é essencial para o desenvolvimento das células endoteliais vasculares e se liga aos VEGF-A, VEGF-C, e VEGF-D (PEPPER et al., 2001; YAMASAKI; MORITA, 2006; HOLMES et al., 2008). Já o VEGFR-3 é decisivo para o desenvolvimento de células endoteliais linfáticas e se liga aos VEGF-C e VEGF-D (PEPPER et al., 2001, YAMASAKI; MORITA, 2006; HOLMES et al., 2008).

O VEGF-A está principalmente relacionado à angiogênese enquanto o VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos na linfangiogênese (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005). Pouco se sabe a respeito do significado da expressão do VEGF-B em neoplasias (NIKI et al., 2000).

O VEGF-C e VEGF-D exercem os seus efeitos sobre células endoteliais por estimulação do receptor 3 de VEGF (VEGFR-3), um receptor de tirosina-quinase expresso predominantemente em células endoteliais linfáticas e que foram identificados como os primeiros fatores linfangiogênicos conhecidos (KARKKAINEN; ALITALO, 2002; FERRARA, GERBER, LECOUTER, 2003; CAO et al., 2004; DA; WU; TIAN, 2008). VEGF-C e VEGF-D são os mais potentes indutores de vasos linfáticos recém-formados, apesar do fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (CHANG et al., 2004) e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (LEONG et al., 2006) também terem sido implicados.

O VEGF-C é sintetizado como uma pré-proteína que posteriormente é submetida a um intrincado processamento proteolítico que irá gerar a forma madura deste fator de crescimento (ROSKOSKI, 2007). Possui uma região com aproximadamente 30% de homologia ao VEGF-A, contudo está mais relacionado ao VEGF-D por compartilharem características na região C e N terminal que apenas ambos apresentam (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

O VEGF-C apresenta modesta participação nos processos angiogênicos. Está envolvido na proliferação e migração de células endoteliais, no aumento da permeabilidade vascular e na linfangiogênese (SAHARINEN et al., 2004; BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005; YAMASAKI; MORITA, 2006). Na linfangiogênese, uma forma imatura do VEGF-C se liga ao VEGFR-3 que é expresso predominantemente em endotélio de capilares linfáticos em adultos; já a forma madura se liga tanto ao receptor VEGFR-2 como ao VEGFR-3 (KAIPAINEN et al., 1995; JOUKOV et al., 1996; YAMASAKI; MORITA, 2006). Sua

participação na linfangiogênese ocorre no desenvolvimento embrionário e na manutenção do endotélio linfático em adultos (ROSKOSKI, 2007), estando a expressão de VEGFR-3 superregulada na diferenciação de células-tronco embrionárias, que são cultivadas sob hipóxia (NILSSON et al., 2004). No entanto, a contribuição da hipóxia na regulação da expressão de VEGFR-3 *in vivo* ainda é incerta (de AQUINO, 2012).

O aumento deste fator em neoplasias malignas correlaciona-se com aumento da disseminação de células neoplásicas para os linfonodos regionais em vários carcinomas, sendo em algumas situações, um potencial indicador prognóstico (JUSSILA; ALITALO, 2002) e representando um potencial alvo de terapias anti-câncer (ROSKOSKI, 2007).

O VEGF-D, de maneira similar ao VEGF-C, é sintetizado como uma pré-proteína que posteriormente é submetida a um intrincado processamento proteolítico que irá gerar a forma madura deste fator de crescimento. O gene do VEGF-D possui sete exons e está localizado no cromossomo X. A forma imatura do VEGF-D irá se ligar ao receptor VEGFR-3, importante na linfangiogênese, enquanto que o VEGF-D maduro pode se ligar ao VEGFR-2 e ao VEGFR-3 (ROSKOSKI, 2007).

As atividades biológicas relacionadas ao VEGF-D são: indução da proliferação e migração de células endoteliais e participação na angiogênese e linfangiogênese (YAMASAKI; MORITA, 2006). Inúmeros tecidos expressam níveis variáveis de VEGF-D. Altos níveis de transcritos podem ser encontrados no pulmão, coração, cólon e no músculo esquelético de humanos adultos (ROSKOSKI, 2007).

O VEGF-D é um importante fator relacionado à linfangiogênese. Descobertas recentes sugerem que a linfangiogênese tumoral, promove metástases linfáticas e que a expressão do VEGF-D encontra-se aumentada em uma série de neoplasias malignas (DUFF et al., 2003; YASUOKA et al., 2005). Este fator de crescimento representa, portanto um potencial alvo terapêutico (ROSKOSKI, 2007) além de um importante parâmetro prognóstico (YASUOKA et al., 2005).

2.3.1 Expressão de VEGF-C e VEGF-D no câncer

A família VEGF consiste em várias glicoproteínas secretadas por leucócitos, células endoteliais e células neoplásicas (JAKOBISIAK; LASEK; GOLAB, 2003; FARNSWORTH; ACHEN; STACKER, 2006;), responsáveis pela regulação de diferentes funções nas células endoteliais, destacando-se: o crescimento, a proliferação, a migração e a diferenciação celular.

Estas glicoproteínas também atuam na permeabilidade e no tônus vascular, na produção de moléculas vasoativas e no estímulo da quimiotaxia à monócitos (TAE et al., 2000; VEIKKOLA et al., 2000).

Acredita-se que a ocorrência de metástase do tumor primário para os linfonodos regionais seja um processo favorecido pela formação de novos vasos linfáticos associados ao tumor (linfangiogênese tumoral) e que o principal eixo de sinalização desse processo seja o VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 (KATO et al., 2006; FAUSTINO, 2010).

A metástase do tumor para os linfonodos regionais muitas vezes representa o primeiro passo de disseminação do tumor e serve como um importante indicador de prognóstico para a progressão dos cânceres humanos. Uma variedade de mecanismos pode contribuir para a disseminação das células malignas dos cânceres primários: a invasão de tecido local, metástase sistêmica para órgãos distantes através de vasos sanguíneos associados ao tumor e metástase linfática para linfonodos sentinela através de vasos linfáticos associados ao tumor, gânglios linfáticos distantes e de lá para órgãos distantes. Esta última constitui a via mais comum de metástase inicial para diversos tipos de tumores sólidos humanos (STACKER et al. 2002; MABY-EL HAJJAMI et al., 2008).

A disseminação de células tumorais dos sítios primários para o sistema linfático é acompanhada pela invasão de vasos linfáticos pré-existent nos tecidos circundantes ou pela invasão em redes linfáticas intratumorais (KARPANEN et al. 2001; MANDRIOTA et al. 2001; SKOBE et al. 2001; STACKER et al., 2001; ALITALO et al 2004; CAO et al 2004; ACHEN et al 2005). Em alguns casos de cânceres humanos a presença de vasos linfáticos no interior do tumor esteve correlacionada positivamente com metástases em linfonodos e mau prognóstico (BEASLEY et al., 2002; KYZAS et al. 2005).

As células tumorais e os macrófagos associados ao tumor podem expressar os fatores linfangiogênicos VEGF-C e VEGF-D, assim, eles podem desempenhar um papel na linfangiogênese peritumoral e na posterior disseminação no câncer humano (SCHOPPMANN et al., 2002). Estudos de tumores em modelos animais têm fornecido evidência experimental direta de que os níveis aumentados de VEGF-C ou VEGF-D promovem a linfangiogênese tumoral e a disseminação do tumor para os linfonodos regionais (KARPANEN et al., 2001; MANDRIOTA et al., 2001; SKOBE et al., 2001; STACKER et al., 2001).

Além disso, um grande número de estudos clínicopatológicos de cânceres humanos tem mostrado uma correlação direta entre a expressão de VEGF-C ou VEGF-D pelas células tumorais e invasão linfática, metástase linfonodal e à distância, e baixa sobrevida do paciente,

mas não necessariamente com a densidade de vasos linfáticos associados ao tumor (PEPPER et al., 2003; ACHEN et al., 2005; TOBLER; DETMAR 2006).

Análise do nível de expressão de VEGF-C e VEGF-D em tecidos tumorais excisados de pacientes revelaram que os níveis destes fatores de crescimento estão associados ao pobre prognóstico e metástases em linfonodos (DENG et al., 2009; KOCH et al., 2009; SCHIMANSKI et al. 2011). Estudos têm indicado que a linfangiogênese tumoral e o crescimento de novos vasos linfáticos, tem sido associado à formação de metástases linfáticas. Esta hipótese baseia-se na observação de que a densidade microvascular linfática (LVD) e a superexpressão de VEGF-C e VEGF-D estão significativamente associados com a extensão da metástase linfonodal (SKOBE et al., 2001; STACHER et al., 2001; MATTILA et al., 2002; VON MARSCHALL et al., 2005). No entanto, ainda resta esclarecer se a função dos linfáticos intratumorais é crucial para a invasão tumoral e metástase a distância (DUONG et al., 2012).

Watanabe et al. (2013) utilizaram 109 casos de carcinoma epidermóide de lábio e cavidade oral para investigar se os riscos de metástase cervical linfonodal são previsíveis através da densidade de vasos linfáticos (LVD), detectada pela imuno-histoquímica utilizando o anticorpo D2-40, e expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D. No estudo a LVD foi significativamente maior em carcinomas epidermóides de lábio que em outras localizações da cavidade oral. A LVD tendeu a diminuir com a progressão da doença, aumento do tamanho do tumor e aumento do tamanho da metástase linfonodal. Dos 109 casos, 84 foram positivos para VEGF-C ou VEGF-D, e todas as lesões positivas para VEGF-C também foram positivas para o VEGF-D. Níveis significativamente mais elevados da expressão de VEGF-C e VEGF-D foram associados com o grande tamanho das metástase linfonodais. Os autores concluíram que a LVD em região peritumoral não indica diretamente o risco de metástases em linfonodos cervicais, mas pode refletir linfangiogênese devido ao VEGF em conjunto com a perda de vasos linfáticos a partir do crescimento e progressão do tumor.

Tampouris et al. (2012) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF-C, VEGF-D e flt-4 em 31 tumores de glândula salivar, divididos em dois grupos: A e B. O grupo A, composto por 19 tumores com diferenciação mioepitelial, sendo 02 mioepiteliomas, 08 adenomas pleomórficos, 05 adenomas de células basais e 04 carcinomas adenoides císticos. O grupo B, constituído por 12 tumores sem diferenciação mioepitelial, sendo 05 tumores de Warthin, 03 carcinomas mucoepidermóides e 04 adenocarcinomas. Os autores não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação a expressão de VEGF-C, VEGF-D e flt-4, contudo quando avaliada a co-expressão de todos os três anticorpos, os tumores com diferenciação mioepitelial mostraram uma superexpressão dos três anticorpos (100% dos casos

de adenoma pleomórfico, 50% dos casos de carcinoma adenoide cístico e 40% dos adenomas de células basais) sendo encontrada diferença estatisticamente significativa.

A elucidação dos mecanismos moleculares de metástase linfática representa um desafio fundamental para a nossa compreensão de como controlar a propagação do câncer nos pacientes. Durante as duas últimas décadas tornou-se evidente que o VEGFR-3 e os seus ligantes VEGF-C e VEGF-D são alvos críticos para o desenvolvimento de uma nova droga. O estudo do desenvolvimento dos vasos linfáticos embrionários revelou fatores chaves que desempenham um papel central no controle da linfangiogênese induzida pelo tumor. Porém apenas o eixo VEGF / VEGF-R tem sido exaustivamente investigado e explorado com vista a restringir o crescimento do tumor e metástases e até agora os resultados em termos de sobrevida do paciente têm sido limitados. Portanto, esforços para identificar fatores e mecanismos moleculares a fim de compreender melhor como a neo-linfangiogênese é regulada e como esta participa da metástase tumoral são fundamentais e podem levar a identificação de potenciais alvos moleculares e o modelo de alternativas terapêuticas da doença metastática.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi detectar e quantificar nas células imunomarcadas as expressões das proteínas VEGF-C e VEGF-D, correlacionando-as com a densidade linfática tumoral, mensurada por meio da expressão imuno-histoquímica do anticorpo D2-40, bem como com a proliferação endotelial linfática utilizando a expressão obtida por dupla marcação pelos anticorpos D2-40 e Ki-67 em uma série de casos de adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides comparando-os com glândula salivar normal. Com isto, pretende-se contribuir com maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos vinculados ao comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi registrado no Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte sendo aprovado através do parecer de Nº 143.795 em 26 de outubro de 2012 (Anexo 1).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo consistiu em uma pesquisa retrospectiva caracterizada pela observação, análise, registro e quantificação da expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D, e mensuração da densidade linfática (D2-40 e Ki-67), por meio de imuno-histoquímica, em adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos, carcinomas mucoepidermóides e em fragmentos de glândula salivar com padrão de normalidade, utilizados como grupo comparativo.

4.3 POPULAÇÃO

A população do estudo foi constituída por todos os casos de adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides arquivados e diagnosticados no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN.

4.4 AMOSTRA

A amostra por conveniência foi constituída por 20 casos de adenoma pleomórfico, 20 casos de carcinoma adenóide cístico e 20 casos de carcinoma mucoepidermóide, todos emblocados em parafina, obtidos nos arquivos do serviço acima citado. Os critérios determinados para inclusão de casos na amostra foram a quantidade de material arquivado e as condições de armazenamento dos espécimes para a realização do estudo imuno-histoquímico.

Também foram selecionados 10 casos de material biológico de biópsias de fibroma e hiperplasia fibrosa que continham tecido glandular salivar com características de normalidade para efeito comparativo do estudo.

4.5 ESTUDO MORFOLÓGICO

A amostra selecionada previamente, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais, por sua vez, foram estendidos em lâminas histológicas e submetidos à coloração de rotina pela técnica da Hematoxilina e Eosina e examinados à microscopia de luz (Olympus CX31, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN).

Foi realizada uma análise descritiva dos aspectos histopatológicos existentes nos adenomas pleomórficos, observando-se aspectos como arranjo arquitetural das células lumbais e não lumbais no parênquima neoplásico, bem como o tipo de estroma presente (fibroso, mixóide, hialino e condróide), além da presença ou ausência de cápsula fibrosa e infiltração focal de células neoplásicas. Estas lesões foram caracterizadas de acordo com a classificação proposta por Seifert et al., 1976 em tipo I ou clássico (quantidade equilibrada entre as células epiteliais e o componente estromal, contendo 30-50% de estroma), tipo II ou mixóide (80% do tumor correspondendo ao estroma mixóide), tipo III ou celular (rico em células, apresentando uma quantidade menor ou igual a 20-50% de estroma) e tipo IV (20-50% de estroma, apresentando uma diferenciação monomórfica focal no componente epitelial).

Nos casos de carcinomas mucoepidermóides, foram avaliados parâmetros microscópicos tais como a presença de espaços císticos, invasão neural, necrose, mitoses e anaplasia e para cada um destes parâmetros foram atribuídas pontuações de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005) (Tabela 1). Os tumores foram então gradados como de baixo grau quando exibiram formação de espaços císticos abundantes, revestidos predominantemente por células mucosas com áreas associadas às células intermediárias e recebem escore de pontuação até 4; de grau intermediário quando exibiram uma menor frequência na formação de espaços císticos associados à células intermediárias e epidermóides, recebendo escore de pontuação de 5-6; e de alto grau, quando exibiram predomínio de células epidermóides além de células mucosas arranjadas em um padrão sólido, com escassas formações císticas recebendo escore de pontuação igual ou superior a 7 (GOODE, EL-NAGGAR, 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008).

Tabela 1. Características histopatológicas, valores pontuais e pontuações utilizadas na gradação do CME de acordo com OMS, 2005.

Característica histopatológicas	Pontuação
Componente cístico < 20%	+2
Invasão neural	+2
Necrose	+3
Mitoses (4 ou + por 10 campos em grande aumento)	+3
Anaplasia	+4
Gradação Tumoral	Pontuação
Baixa	0 - 4
Intermediária	5 - 6
Alta	7 ou mais

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2005.

Nos casos de carcinomas adenóides císticos, foi avaliado o padrão histopatológico predominante, ou seja, tubular, cribriforme ou sólido de acordo com El-Naggar e Huvos (2005), sendo então gradados em três níveis, grau I quando exibiam padrão predominantemente tubular, com áreas cribriformes, grau II quando exibiam predominantemente o padrão cribriforme, com áreas tubulares e algumas áreas sólidas dispersas e em grau III quando predominava o padrão sólido.

4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.6.1 Método imuno-histoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais, por sua vez, foram estendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com adesivo à base de organosilano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase, com detecção por meio do sistema EnVision™ + Dual Link System HRP (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos policlonais anti-VEGF-C e anticorpo monoclonal anti-VEGF-D (Quadro 1).

O controle positivo para os anticorpos anti-VEGF-C e anti-VEGF-D foi realizado com cortes histológicos de placenta. O controle negativo consistiu na substituição dos anticorpos

primários por albumina de soro bovino a 1% (BSA - Bovine Serum Albumin) em solução tampão. A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- ⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (Quadro 2);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (Antibody diluent with background reducing components, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (EnVision™ + Dual Link System HRP, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos); (Quadro 1)
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em xilol (3 trocas) (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 1. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone/ Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
VEGF-C	C-20	Abcam	1:200	Citrato, pH 6,0 Pascal, 3 min	Overnight (18 horas)
VEGF-D	X142	Abcam	1:200	Citrato, pH 6,0 Pascal, 3 min	Overnight (18 horas)

Especificamente para os anticorpos monoclonais anti-D2-40 e anti-Ki-67 (Quadro 2), foi empregada a técnica de dupla marcação (EnVision™ Gl2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a qual foi otimizada em nosso Serviço. O controle positivo para os anticorpos anti-D2-40 e anti-Ki-67 foi realizado com cortes histológicos de intestino e tonsila, respectivamente. O controle negativo consistiu na substituição dos anticorpos primários por albumina de soro bovino a 1% (BSA) em solução tampão. A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- ⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Recuperação antigênica;

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Incubação com a enzima de bloqueio Dual Endogenous Enzyme Block (EnVision™ G|2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (5 minutos);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário D2-40, em solução diluente (Antibody diluent with background reducing components, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Incubação com polímero Polymer/HRP (20 minutos);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate, EnVision™ G|2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Incubação com a enzima de bloqueio Doublestain Block (EnVision™ G|2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (5 minutos);

- ⇒ Incubação com o segundo anticorpo primário Ki-67 em solução diluente (Antibody diluent with background reducing components, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Incubação com o LINK Rabbit/Mouse (EnVision™ Gl2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (20 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Incubação com o polímero Polymer/AP (EnVision™ Gl2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (20 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Incubação com fast red (Permanent Red Substrate Buffer + Permanent Red) (EnVision™ Gl2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em xilol (3 trocas) (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 2: Especificidade, clone e fabricante dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone/ Referência	Fabricante
D2-40	D2-40	Dako
Ki-67	MIB-1	Dako

4.6.2 Análise imuno-histoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imuno-histoquímico, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (Microscópio Olympus CX31, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN), por um examinador previamente treinado. As imunoexpressões de VEGF-C e VEGF-D foram analisadas com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Schoppmann et al. (2006). Sob aumento de 100×, foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos referenciados anteriormente. Foram determinadas as quantidades de células do parênquima tumoral apresentando positividade de expressão citoplasmática e de células negativas. Com os dados obtidos nestes 5 campos, foi estabelecido o percentual de células positivas para cada caso. Posteriormente, os casos foram classificados de acordo com os seguintes escores: 0 (até 10% das células positivas), 1 (11% - 50% das células positivas), 2 (51% - 80% das células positivas) e 3 (mais de 80% das células positivas). Deve-se destacar que foram realizadas análises individualizadas da área intratumoral e peritumoral.

A avaliação da densidade linfática tumoral foi realizada de forma quantitativa, utilizando-se a metodologia descrita no estudo de Kyzas et al. (2005). Sob aumento de 200×, foram quantificados os vasos imunopositivos ao anticorpo anti-D2-40 presentes em todo o corte histológico. Destaca-se que a análise foi realizada tanto nas áreas internas dos tumores, estabelecendo-se a densidade linfática intratumoral (DLI), como em uma área de até 500µm a partir da periferia do tumor, estabelecendo-se a densidade linfática peritumoral (DLP). Subsequentemente, os dados obtidos nas áreas peritumorais e intratumorais foram somados, estabelecendo-se a densidade linfática total (DLT) do caso. Além disso, os casos foram classificados de acordo com a presença ou ausência de invasão de vasos linfáticos, tanto nas áreas intratumorais como nas áreas peritumorais, caracterizada pela presença de pelo menos um grupo de células tumorais no interior de um vaso imunomarcado pelo anticorpo anti-D2-40 (KYZAS et al., 2006).

Finalmente, durante a avaliação da densidade linfática tumoral, foi realizada a análise da proliferação endotelial linfática, por meio da contagem das células endoteliais simultaneamente positivas para os anticorpos anti-D2-40 e anti-Ki-67 (SOARES et al., 2007).

Nos casos de tecido glandular salivar normal, foi avaliada a marcação citoplasmática das células do parênquima glandular. Como as células mioepiteliais, principalmente as presentes em torno dos ácinos e ductos intercalares mostram expressão positiva para D2-40 (SALZMAN et al. 2014), dupla marcação D2-40/Ki-67 foi utilizada em cortes seriados para

confirmar a identidade dos vasos linfáticos. Para os anticorpos VEGF-C e VEGF-D também foi realizada a avaliação da marcação citoplasmática das células do parênquima glândular.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007[®]) e, posteriormente, exportados para o programa Statistical Package for the Social Sciences (versão 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para comparação entre as medianas das neoplasias estudadas, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. A correlação entre as médias das áreas centrais e peritumorais dos tumores bem como a densidade linfática e proliferação endotelial linfática foram avaliadas utilizando o teste de Spearman. O $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

5.1.1 Adenoma Pleomórfico

O estudo microscópico dos adenomas pleomórficos revelou aspectos morfológicos inerentes a esta neoplasia, no qual o parênquima tumoral exibia intensa proliferação de células epiteliais e mioepiteliais com morfologia que variava entre plasmocitóide, fusiforme, cuboidal, poligonal, basalóide e escamosa, com predomínio de células do tipo plasmocitóide. Essas células estavam dispostas em cordões, ninhos, ilhas e lençóis sólidos com quantidade variável de estruturas ductiformes revestidas por duas ou mais camadas de células, exibindo por vezes material eosinofílico amorfo na porção luminal.

O estroma tumoral também apresentou-se bastante variável incluindo os subtipos hialino, fibroso, mixóide, condróide e mixocondróide. Na maioria dos casos foi evidenciada, em um mesmo tumor, diferentes proporções de mais de um tipo de arranjo estromal. Os estromas do tipo hialino e fibroso foram os mais frequentes, enquanto o tipo condróide foi o menos frequente.

Em relação a presença de cápsula, 70% (14 casos) dos tumores apresentava-se delimitado perifericamente por uma cápsula fibrosa, destes 71,42% (10 casos) exibiram cápsula fibrosa delgada e incompleta e os demais, apresentaram uma cápsula fibrosa e completa, de espessura variável.

Os adenomas pleomórficos foram classificados histopatologicamente de acordo com Seifert et al. (1976) com base na diferenciação das células epiteliais e na quantidade e natureza do estroma nos subtipos clássico, mixóide e celular. Entre os casos estudados, 10 (50%) corresponderam ao subtipo celular (rico em células) (Figura 3), caracterizado por uma proliferação de células epiteliais arranjadas em cordões sólidos, por vezes formando estruturas ductiformes de tamanhos variados em meio a escasso estroma tumoral. Oito casos (40%) foram classificados como do subtipo clássico (Figura 1), no qual havia uma quantidade equilibrada entre as células epiteliais, mioepiteliais e o componente estromal. Por fim, 2 (10%) dos casos corresponderam ao subtipo mixóide (Figura 2), no qual se evidenciavam células com morfologia variável, predominantemente fusiformes e piramidais dispostas de forma isolada ou

formando pequenos agrupamentos celulares, dispersas em um rico estroma que correspondia a mais de 80% do tumor (Tabela 2).

5.1.2 Carcinoma Mucoepidermóide

Os casos de carcinoma mucoepidermóide avaliados, exibiram uma proliferação de células mucosas, intermediárias e epidermóides em proporções variadas. Estas células, em conjunto, arranjavam-se na forma de lençóis, ilhas e ninhos que, na maioria dos casos, se abriam formando espaços císticos, por vezes papilares císticos, com predomínio de células mucosas e intermediárias.

Os carcinomas mucoepidermóides foram avaliados de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005), nos quais parâmetros microscópicos tais como a presença de espaços císticos, invasão neural, necrose, mitoses e anaplasia recebem pontuações permitindo que os tumores sejam então gradados em tumores de baixo grau, grau intermediário e de alto grau. Entre os casos estudados, 11 (55%) foram classificados como de baixo grau de malignidade (Figura 4) por exibirem formação de espaços císticos abundantes revestidos predominantemente por células mucosas com áreas associadas às células intermediárias. Seis (30%) casos foram classificados como de alto grau (Figura 6) de malignidade por exibirem predomínio de células epidermóides além de células mucosas arranjas em um padrão sólido, com escassas formações císticas. Três (15%) casos foram classificados como de grau intermediário (Figura 5) por exibirem menor frequência de formação de espaços císticos associadas às células intermediárias e epidermóides (Tabela 2).

5.1.3 Carcinoma Adenóide Cístico

Os carcinomas adenóides císticos avaliados exibiram arranjo morfológico típico, caracterizado pela proliferação de células epiteliais e mioepiteliais de formato que variava de arredondado a cuboidal, com grandes núcleos ovais, hipercromáticos e citoplasma frequentemente escasso. As células proliferantes encontravam-se organizadas em espaços pseudocísticos, estruturas tubulares, trabeculares, ninhos e cordões, resultando nos três padrões histopatológicos: cribriforme, tubular e sólido. Entre os casos analisados, observou-se ora a

presença de um único padrão histopatológico ora a presença de proporções variadas dos três padrões morfológicos.

Os casos de carcinoma adenóide cístico foram avaliados quanto ao padrão histopatológico predominante, ou seja, tubular, cribriforme ou sólido de acordo com o proposto por El-Naggar e Huvos (2005), sendo então gradados em três níveis, o grau I foi atribuído a 6 (30%) casos que exibiram um padrão predominantemente tubular (Figura 7), com áreas cribriformes; grau II foi atribuído a 7 (35%) casos que exibiram predominantemente o padrão cribriforme (Figura 8), com áreas tubulares e algumas áreas sólidas dispersas e o grau III foi identificado em 7 (35%) casos em que predominava o padrão sólido (Figura 9) (Tabela 2).

Tabela 2. Número e percentual em relação ao subtipo/gradação/padrão histopatológico de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.

Grupo	Subtipo/Gradação/Padrão Histológico	n	%
Adenoma Pleomórfico	Clássico	08	40
	Mixóide	02	10
	Celular	10	50
Carcinoma Mucoepidermóide	Baixo	11	55
	Intermediário	03	15
	Alto	06	30
Carcinoma Adenóide Cístico	Tubular	06	30
	Cribriforme	07	35
	Sólido	07	35

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.2.1 Análise da imunoexpressão de VEGF-C e VEGF-D

A análise da expressão de VEGF-C revelou uma marcação predominantemente citoplasmática e de intensidade variada sem um padrão definido de distribuição. A marcação pelo anticorpo VEGF-C em glândula salivar normal é evidenciada na figura 10.

Na expressão desta proteína em região peritumoral, os adenomas pleomórficos revelaram maior frequência do escore 3 (n = 10; 50%), seguido dos escores 2 (n = 7; 35%), 1 (n = 2; 10%) e 0 (n = 1; 5%). Nos carcinomas mucoepidermóides, a maioria dos casos foi classificada como escore 3 (n = 11; 55%), seguido dos escores 2 (n = 7; 35%) e 1 (n = 2; 10%). Para os carcinomas adenóides císticos verificou-se frequências maiores para os escore 1 e 3 (n = 7; 35%) e frequências menores para os escores 0 e 2 (n = 3; 15%).

Em relação à expressão de VEGF-C em região intratumoral das lesões, os adenomas pleomórficos (Figuras 11, 12 e 13) exibiram predomínio do escore 2 (n = 11; 55%), seguido dos escores 3 (n = 6; 30%), 0 (n = 2; 10%) e 1 (n = 1; 5%). Entre os carcinomas mucoepidermóides (Figuras 14, 15 e 16), verificou-se que a maioria dos casos foi classificada como escore 3 (n = 13; 65%), seguido pelos escores 2 (n = 4; 20%) e 1 (n = 3; 15%). Para os carcinomas adenóides císticos (Figuras 17, 18 e 19) verificou-se a maior frequência de escore 3 (n = 13; 65%), seguido pelos escores 1 (n = 3; 15%), 0 e 2 (n = 2; 10%).

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a expressão de VEGF-C peritumoral (p = 0,544) e intratumoral (p = 0,089) (Tabela 3).

Tabela 3: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de expressão de VEGF-C em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.

Região	Grupo	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	P*
Peritumoral	AP	20	2,00	2,00 - 2,75	30,23	2,139	0,544
	CME	20	3,00	2,00 – 3,00	40,03		
	CAC	20	1,50	1,00 – 2,00	27,00		
Intratumoral	AP	20	2,50	2,00 – 3,00	30,90	6,505	0,089
	CME	20	3,00	2,00 – 3,00	35,60		
	CAC	20	3,00	1,25 – 3,00	34,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

AP – Adenoma pleomórfico; CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

*Teste de Kruskal-Wallis

A expressão de VEGF-C em relação a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides e os subtipos histopatológicos de carcinomas adenóides císticos

é demonstrada na tabela 4. A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides em relação a expressão de VEGF-C peritumoral ($p = 0,559$) e intratumoral ($p = 0,983$).

De maneira semelhante, a análise dos carcinomas adenóides císticos também não revelou diferença estatisticamente significativa entre os subtipos histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos em relação à expressão de VEGF-C peritumoral ($p = 0,467$). Entretanto, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a expressão de VEGF-C intratumoral para os carcinomas adenóides císticos ($p = 0,004$).

Tabela 4: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a expressão de VEGF-C em relação à gradação histopatológica dos carcinomas mucoepidermóides e padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014.

	Grupo	N	Mediana	Q25-Q75	Média dos postos	KW	P*
Peritumoral							
CME	Baixo	11	3,00	2,00 – 3,00	10,91	1,163	0,559
	Intermediário	03	2,00	1,00 -	7,50		
	Alto	06	3,00	1,75 – 3,00	11,25		
CAC	Tubular	06	2,00	0,75 -3,00	11,17	11,522	0,467
	Cribriforme	07	1,00	0,00 – 2,00	8,43		
	Sólido	07	2,00	1,00 – 3,00	12,00		
Intratumoral							
CME	Baixo	11	3,00	2,00 – 3,00	10,59	0,035	0,983
	Intermediário	03	3,00	1,00 -	10,00		
	Alto	06	3,00	1,75 – 3,00	10,58		
CAC	Tubular	06			14,00	1,225	0,004
	Cribriforme	07	1,00	0,00 – 2,00	5,43		
	Sólido	07	3,00	3,00 – 3,00	12,57		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

*Teste de Kruskal-Wallis

A análise da expressão de VEGF-D revelou uma marcação predominantemente citoplasmática e de baixa intensidade, sem um padrão definido de distribuição. A marcação pelo anticorpo VEGF-D em glândula salivar normal é evidenciada na figura 30.

Na expressão desta proteína em região peritumoral, os adenomas pleomórficos exibiram predomínio do escore 0 (n = 17; 85%), seguido do escore 1 (n = 3; 15%). Nos carcinomas mucoepidermóides, a maioria dos casos também foi classificada como escore 0 (n = 15; 75%), seguido dos escores 1 (n = 4; 20%) e 2 (n = 1; 5%). Para os carcinomas adenóides císticos verificou-se maior frequência para o escore 0 (n = 17; 85%) e as menores frequências foram encontradas para os escores 1 (n = 2; 10%) e 2 (n = 1; 5%).

Em relação à expressão de VEGF-D em região intratumoral das lesões, os adenomas pleomórficos (Figuras 21, 22 e 23) exibiram maior frequência do escore 0 (n = 14; 70%), seguido dos escores 1 (n = 4; 20%) e 2 (n = 2; 10%). Entre os carcinomas mucoepidermóides (Figuras 24, 25 e 26) verificou-se que a maioria dos casos foi classificada como escore 0 (n = 13; 65%), seguido dos escores 1 (n = 6; 30%) e 2 (n = 1; 5%). Para os carcinomas adenóides císticos (Figuras 27, 28 e 29) verificou-se a maior frequência de escore 0 (n = 14; 70%), seguido pelos escores 1 (n = 5; 25%) e 2 (n = 1; 5%).

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a expressão de VEGF-D peritumoral (p = 0,544). Contudo, para a expressão de VEGF-D intratumoral verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p = 0,001) (Tabela 5).

Tabela 5: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de expressão de VEGF-D em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.

Região	Grupo	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	P*
Peritumoral	AP	20	0,00	0,00 – 0,00	34,60	1,397	0,706
	CME	20	0,00	0,00 – 0,75	38,30		
	CAC	20	0,00	0,00 -0,00	34,90		
Intratumoral	AP	20	0,00	0,00 – 1,00	36,40	16,357	0,001
	CME	20	0,00	0,00 – 1,00	37,55		
	CAC	20	0,00	0,00 – 1,00	35,90		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

AP – Adenoma pleomórfico; CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

*Teste de Kruskal-Wallis

A expressão de VEGF-D em relação a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides e os subtipos histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos é demonstrada na tabela 6. A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides em relação a expressão de VEGF-D peritumoral ($p = 0,829$) e intratumoral ($p = 0,308$).

Tabela 6: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a expressão de VEGF-D em relação à gradação/padrão histopatológico dos carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014.

	Grupo	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	P*
Peritumoral							
CME	Baixo	11	3,00	0,00 – 1,00	10,82	0,374	0,829
	Intermediário	03	3,00	0,00 -	11,17		
	Alto	06	3,00	0,00 – 0,25	9,58		
CAC	Tubular	06		0,00 – 1,25	12,42	2,810	0,245
	Cribriforme	07	1,00		9,00		
	Sólido	07	3,00	0,00-0,00	10,36		
Intratumoral							
CME	Baixo	11	0,00	0,00 – 1,00	9,59	2,357	0,308
	Intermediário	03	1,00	0,00 -	14,50		
	Alto	06	0,00	0,00 – 1,00	10,17		
CAC	Tubular	06	0,00	0,00 – 1,25	11,17	1,315	0,518
	Cribriforme	07	0,00	0,00 – 0,00	8,86		
	Sólido	07	0,00	0,00 – 1,00	11,57		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

*Teste de Kruskal-Wallis

A análise dos carcinomas adenóides císticos também não revelou diferença estatisticamente significativa entre os subtipos histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos em relação a expressão de VEGF-D peritumoral ($p = 0,245$) e VEGF-D intratumoral ($p = 0,518$).

5.2.2 Análise da imunexpressão da dupla marcação D2-40/Ki-67

5.2.2.1 Análise da densidade linfática

A avaliação das neoplasias e das glândulas salivares normais imunomarcadas com o anticorpo D2-40, revelou a imunexpressão deste epítipo no citoplasma de células individuais e em grupos de células endoteliais linfáticas com lúmen vascular distinto.

A análise da densidade linfática peritumoral demonstrou para o grupo dos adenomas pleomórficos valores que variaram de zero a 33,00, com uma mediana de 1,50 (Figura 30). No grupo dos carcinomas mucoepidermóides foram observados valores que variaram de zero a 22,00, com uma mediana de 4,00 (Figura 31). Para os carcinomas adenóides císticos, os valores variaram de zero a 40,00, com mediana de 7,00 (Figura 32). Na análise em glândula salivar normal (controle), foram observados valores que variaram de zero a 33,00, com uma mediana de 2,50. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com as maiores densidades linfáticas peritumorais encontradas em carcinomas adenóides císticos e as menores em adenomas pleomórficos ($p = 0,047$) (Tabela 7).

Tabela 7. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.

	Grupo	n	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos Postos	KW	p*
DLP	AP	20	1,50	0,00 – 5,50	27,15	7,949	0,047
	CME	20	4,00	0,25 – 10,00	36,13		
	CAC	20	7,00	2,50 – 16,25	44,68		
	Controle	10	2,50	0,00 – 13,00	32,60		
DLI	AP	20	0,00	0,00 – 0,00	19,68	24,533	0,000
	CME	20	5,50	0,00 – 22,00	43,73		
	CAC	20	7,00	0,50 – 21,50	45,80		
	Controle	10	0,00	0,00 – 5,25	30,10		
DLT	AP	20	1,50	0,00 – 5,50	21,08	21,735	0,000
	CME	20	12,50	4,25 – 27,50	42,80		
	CAC	20	16,00	7,75 – 39,00	47,30		
	Controle	10	2,50	0,00 – 12,75	26,15		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

DLP – Densidade Linfática Peritumoral; DLI – Densidade Linfática Intratumoral; DLT – Densidade Linfática Total; AP – Adenoma pleomórfico; CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico; Controle – Glândula salivar normal

*Teste de Kruskal-Wallis

Na análise da densidade linfática intratumoral, o grupo dos adenomas pleomórficos exibiram valores que variaram de zero a 3,00, com uma mediana de zero (Figura 33). No grupo dos carcinomas mucoepidermóides foram observados valores que variaram de zero a 51,00 com uma mediana de 5,50 (Figura 34). Para os carcinomas adenóides císticos, os valores médios variaram de zero a 49,00 com mediana de 7,00 (figura 35) e no grupo das glândulas salivares normais (controle), foram observados valores médios que variaram de zero a 17,00, com uma mediana de zero. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com as maiores densidades linfáticas intratumorais encontradas em carcinomas adenóides císticos e as menores em adenomas pleomórficos ($p < 0,001$) (Tabela 7).

Quando avaliada a densidade linfática total, o grupo dos adenomas pleomórficos exibiu valores que variaram de zero a 36,00, com uma mediana de 1,50. No grupo dos carcinomas mucoepidermóides foram observados valores que variaram de zero a 71,00, com uma mediana

de 12,50. Para os carcinomas adenóides císticos, os valores variaram de zero a 77,00, com mediana de 16,00, enquanto que para o grupo das glândulas salivares normais (controle) os valores variaram de zero a 22,00, com uma mediana de 2,50.

O teste de Kruskal-Wallis revelou existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com as maiores densidades linfáticas tumorais encontradas em carcinomas adenóides císticos e as menores em adenomas pleomórficos ($p < 0,001$) (Tabela 7).

A avaliação da densidade linfática tumoral em relação à gradação histopatológica dos carcinomas mucoepidermóide é demonstrada na tabela 8. Os carcinomas mucoepidermóides de grau intermediário exibiram valores maiores de densidade linfática peritumoral, com uma mediana de 10,00, em sequência os de baixo grau, com uma mediana de 4,00 e os de alto grau apresentaram mediana de 1,00. Para a densidade linfática intratumoral, os carcinomas mucoepidermóides também demonstraram maiores valores para o grau intermediário, com mediana de 16,00, seguidos pelos de baixo grau com mediana de 5,00 e os de alto grau com mediana de 4,00.

Tabela 8: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos graus histopatológicos dos carcinomas mucoepidemóides. Natal, RN – 2014.

	Grau Histológico	n	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos postos	KW	P*
DLP	Baixo	11	4,00	1,00 – 10,00	10,55	2,522	0,283
	Intermediário	03	10,00	3,00 -	14,83		
	Alto	06	1,00	0,00 – 10,25	8,25		
DLI	Baixo	11	5,00	0,00 – 23,00	10,18	1,091	0,579
	Intermediário	03	16,00	1,00 -	13,67		
	Alto	06	4,00	0,00 – 15,50	9,50		
DLT	Baixo	11	16,00	5,00 – 28,00	10,91	1,413	0,493
	Intermediário	03	26,00	4,00 –	13,17		
	Alto	06	7,00	1,50 – 23,75	8,42		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

DLP – Densidade Linfática Peritumoral; DLI – Densidade Linfática Intratumoral; DLT – Densidade Linfática Total

*Teste de Kruskal-Wallis

Na avaliação da densidade linfática total, as lesões de grau intermediário apresentaram mediana de 26,00, em sequência as lesões de baixo grau com mediana de 16,00 e as de alto grau com mediana de 7,00. A análise estatística demonstrou não existir diferença entre os graus histopatológicos desta lesão em relação a densidade linfática peritumoral ($p = 0,283$), intratumoral (0,579) e total ($p = 0,493$) (tabela 8).

Verificou-se na avaliação entre os casos de carcinomas adenóides císticos que o padrão tubular apresentou valores mais elevados de densidade linfática peritumoral, com mediana de 20,50, em sequência o padrão sólido com mediana de 7,00 e o cribriforme com mediana de 5,00 ($p = 0,050$). Para a densidade linfática intratumoral, o padrão tubular apresentou mediana de 21,00, o sólido apresentou a mediana de 6,00 e o cribriforme a mediana de 5,00 ($p = 0,436$). Na avaliação da densidade linfática total, foi encontrada mediana de 44,50 para o padrão tubular, mediana de 13,00 para o padrão sólido e mediana de 12,00 para o cribriforme ($p = 0,129$) (Tabela 9).

A aplicação do teste estatístico de Kruskal-Wallis não revelou existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação gradação ou padrão histológico apresentado e a densidade endotelial linfática peritumoral, intratumoral e total (Tabela 8 e 9).

Tabela 9: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos. Natal, RN – 2014.

	Padrão Histológico	n	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos postos	KW	P*
DLP	Tubular	06	20,50	11,50 – 34,75	15,42	6,005	0,050
	Cribriforme	07	5,00	2,00 – 10,00	8,21		
	Sólido	07	7,00	0,00 – 14,00	8,57		
DLI	Tubular	06	21,00	2,25 – 40,00	13,00	1,662	0,436
	Cribriforme	07	5,00	0,00 – 17,00	8,93		
	Sólido	07	6,00	2,00 – 17,00	9,93		
DLT	Tubular	06	44,50	14,50 – 74,00	14,58	4,102	0,129
	Cribriforme	07	12,00	7,00 – 22,00	8,57		
	Sólido	07	13,00	2,00 – 31,00	8,98		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

DLP – Densidade Linfática Peritumoral; DLI – Densidade Linfática Intratumoral; DLT – Densidade Linfática Total

*Teste de Kruskal-Wallis

5.2.2.2 Análise da proliferação endotelial linfática

Na avaliação da proliferação endotelial linfática das neoplasias constantes no presente estudo e em glândula salivar normal foram observados vasos linfáticos duplamente marcados apresentando imunexpressão citoplasmática para o anticorpo D2-40 e imunexpressão nuclear para o anticorpo Ki-67 (Figura 36).

Na avaliação da dupla marcação D2-40/Ki-67, o grupo dos adenomas pleomórficos exibiu valores que variaram de zero a 7,00, com mediana encontrada de zero (Figura 37). Em relação ao grupo dos carcinomas mucoepidermóides, os valores variaram de zero a 8,00, com mediana de zero (Figura 38). No grupo dos carcinomas adenóides císticos foi observado valores que variaram de 0 a 7,00, com mediana encontrada de zero (Figura 39). Na avaliação do grupo glândula salivar normal (controle) os valores variaram de zero a 2,00, com uma mediana de zero.

A análise estatística demonstrou não existir diferença significativa entre os grupos em relação à proliferação endotelial linfática ($p = 0,149$) (Tabela 10).

Tabela 10: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os vasos duplamente marcados com D2-40/Ki-67 em relação aos grupos de neoplasias de glândulas salivares e glândula salivar normal. Natal, RN – 2014.

Grupo	n	Mediana	Q ₂₅ -Q _{7,5}	Média dos postos	KW	P*
Adenoma Pleomórfico	20	0,00	0,00 – 0,00	31,20	5,339	0,149
Carcinoma Mucoepidermóide	20	0,00	0,00 – 1,75	38,18		
Carcinoma Adenóide Cístico	20	0,00	0,00 – 7,00	40,35		
Glândula Salivar Normal	10	0,00	0,00 – 2,00	29,05		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

A distribuição dos casos de acordo com os subtipos histopatológicos dos adenomas pleomórficos, carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos, a mediana, quartis 25 e 75, média dos postos e estatística Kruskal-Wallis é apresentada na tabela 11. Em

virtude do pequeno número de casos do subtipo histopatológico mixóide dos adenomas pleomórficos, bem como nos carcinomas mucoepidermóides de grau intermediário, não foi possível realizar análise estatística de possíveis diferenças na densidade linfática entre os diversos subtipos/ graus histológicos destas neoplasias de glândula salivar.

Tabela 11: Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os vasos duplamente marcados com D2-40/Ki-67 em relação ao subtipo/grau/padrão histopatológico de neoplasias de glândulas salivares. Natal, RN – 2014.

Grupo	Subtipo/Grau/Padrão Histológico	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	P*
AP	Clássico	08	0,00	0,00 – 0,00	10,19	2,652	0,265
	Mixóide	02	3,50	0,00 -	14,50		
	Celular	10	0,00	0,00 – 0,00	9,95		
CME	Baixo	11	0,00	0,00 – 2,00	11,50	1,713	0,425
	Intermediário	03	0,00	0,00 -	11,33		
	Alto	06	0,00	0,00 – 0,25	8,25		
CAC	Tubular	06	1,00	0,00 – 2,50	12,08	1,347	0,510
	Cribriforme	07	0,00	0,00 – 2,00	10,93		
	Sólido	07	0,00	0,00 – 1,00	8,71		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

AP – Adenoma pleomórfico; CME – Carcinoma Mucoepidermóide; CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

*Teste de Kruskal-Wallis

Foram analisadas possíveis correlações entre a densidade linfática tumoral e os escores de expressão do VEGF-C e VEGF-D nos adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides. Para todos os grupos estudados, não foram constatadas correlações significativas entre a densidade linfática tumoral e a expressão do VEGF-C (Tabela 12) e VEGF-D (Tabela 13).

Tabela 12: Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a densidade linfática tumoral em relação aos escores de expressão de VEGF-C nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014.

Grupos	N	r	P
Adenoma Pleomórfico			
DLI x VEGF-C (i)	20	- 0,349	0,132
DLP x VEGF-C (p)	20	0,112	0,640
Carcinoma Mucoepidermóide			
DLI x VEGF-C (i)	20	- 0,317	0,173
DLP x VEGF-C (p)	20	0,081	0,736
Carcinoma Adenóide Cístico			
DLI x VEGF-C (i)	20	0,159	0,504
DLP x VEGF-C (p)	20	0,206	0,383

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

DLI – Densidade linfática intratumoral; DLP – Densidade linfática peritumoral; (i) – intratumoral; (p) peritumoral

Tabela 13: Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a densidade linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-D nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014.

Grupos	N	r	P
Adenoma Pleomórfico			
DLI x VEGF-D (i)	20	0,296	0,205
DLP x VEGF-D (p)	20	-0,390	0,089
Carcinoma Mucoepidermóide			
DLI x VEGF-D (i)	20	0,185	0,434
DLP x VEGF-D (p)	20	-0,387	0,092
Carcinoma Adenóide Cístico			
DLI x VEGF-D (i)	20	0,137	0,564
DLP x VEGF-D (p)	20	0,286	0,221

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

DLI – Densidade linfática intratumoral; DLP – Densidade linfática peritumoral; (i) – intratumoral; (p) peritumoral

Possíveis correlações entre a proliferação endotelial linfática e os escores de expressão do VEGF-C e VEGF-D nos adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides também foram avaliadas. Para todos os grupos estudados, não foram constatadas correlações significativas entre a proliferação endotelial linfática e a expressão do VEGF-C (Tabela 14) e VEGF-D (Tabela15).

Tabela 14: Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a proliferação endotelial linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-C nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014.

Grupos	N	r	P
Adenoma Pleomórfico			
PEL x VEGF-C (i)	20	- 0,347	0,134
PEL x VEGF-C (p)	20	- 0,280	0,231
Carcinoma Mucoepidermóide			
PEL x VEGF-C (i)	20	0,191	0,421
PEL x VEGF-C (p)	20	0,121	0,613
Carcinoma Adenóide Cístico			
PEL x VEGF-C (i)	20	- 0,059	0,806
PEL x VEGF-C (p)	20	- 0,409	0,073

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

PEL – Proliferação endotelial linfática; (i) – intratumoral; (p) peritumoral

Tabela 15: Tamanho da amostra, valor estatístico para o coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para a proliferação endotelial linfática em relação aos escores de expressão de VEGF-D nas neoplasias de glândula salivar. Natal, RN – 2014.

Grupos	n	r	P
Adenoma Pleomórfico			
PEL x VEGF-D (i)	20	0,027	0,910
PEL x VEGF-D (p)	20	- 0,176	0,458
Carcinoma Mucoepidermóide			
PEL x VEGF-D (i)	20	- 0,176	0,457
PEL x VEGF-D (p)	20	0,024	0,920
Carcinoma Adenóide Cístico			
PEL x VEGF-D (i)	20	- 0,038	0,874
PEL x VEGF-D (p)	20	0,122	0,609

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

PEL – Proliferação endotelial linfática; (i) – intratumoral; (p) peritumoral

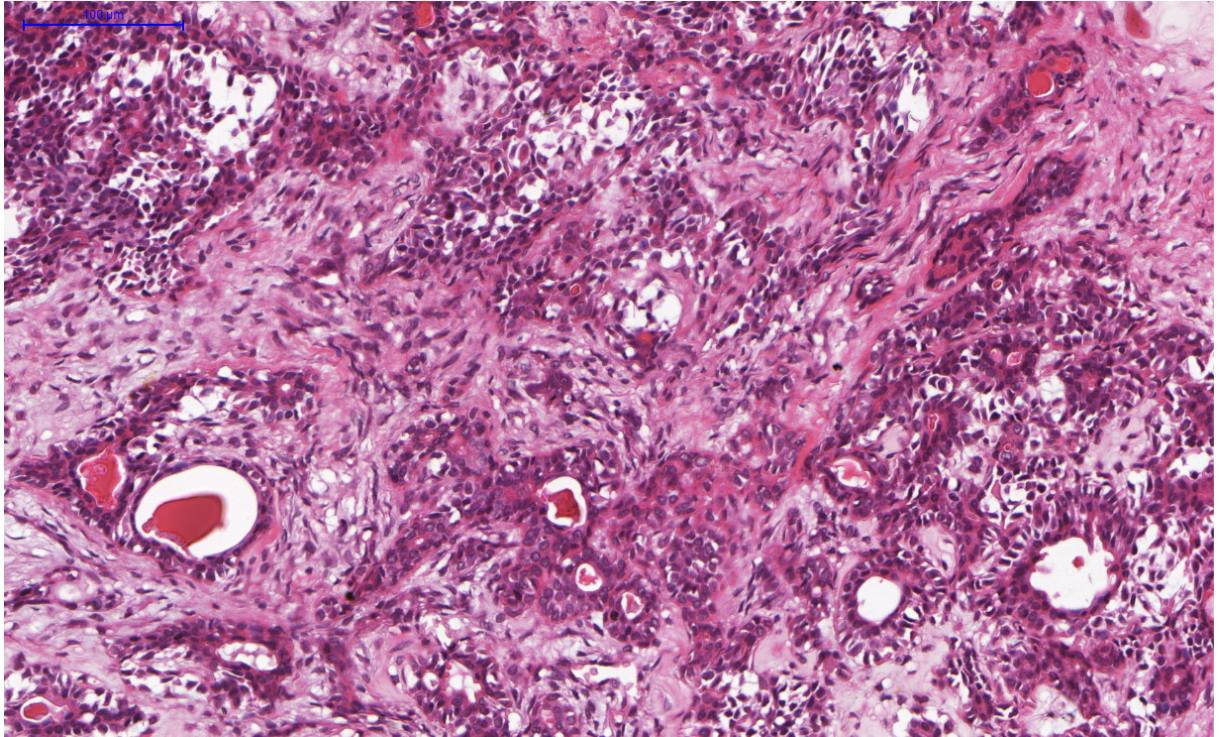


Figura 1. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo clássico. (Pannoramic Viewer, H/E).

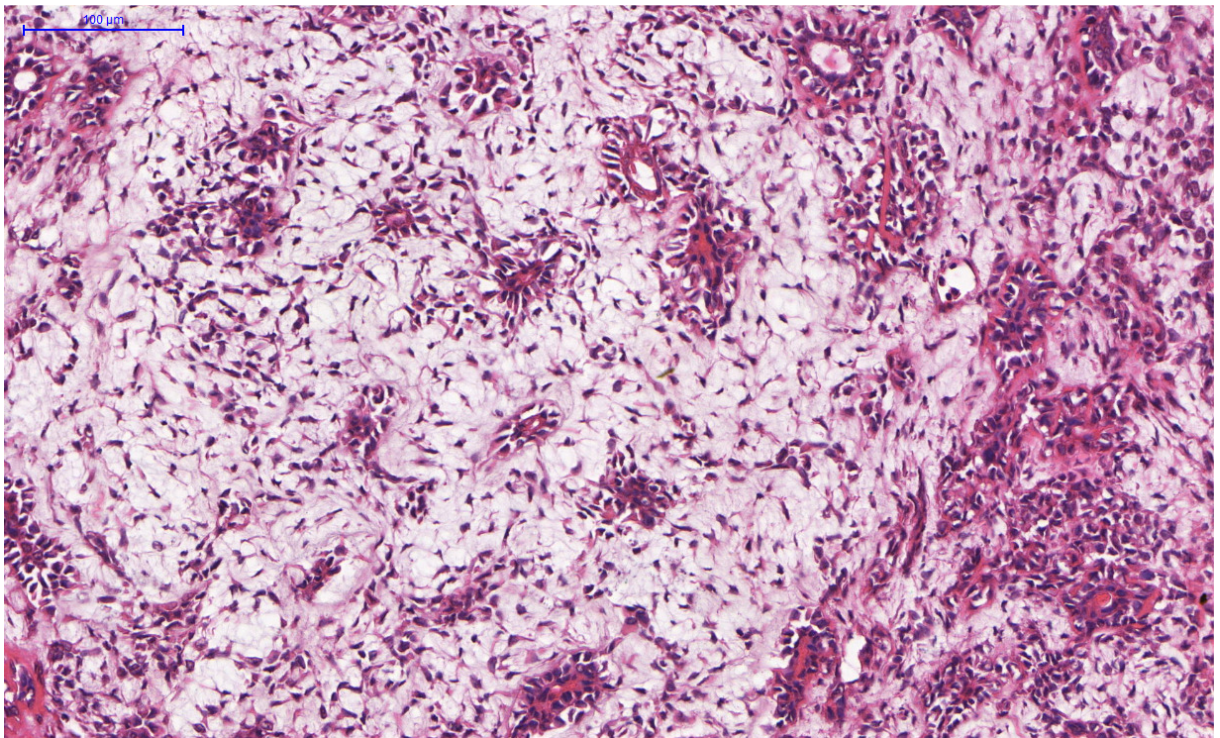


Figura 2. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo mixóide. (Pannoramic Viewer, H/E).

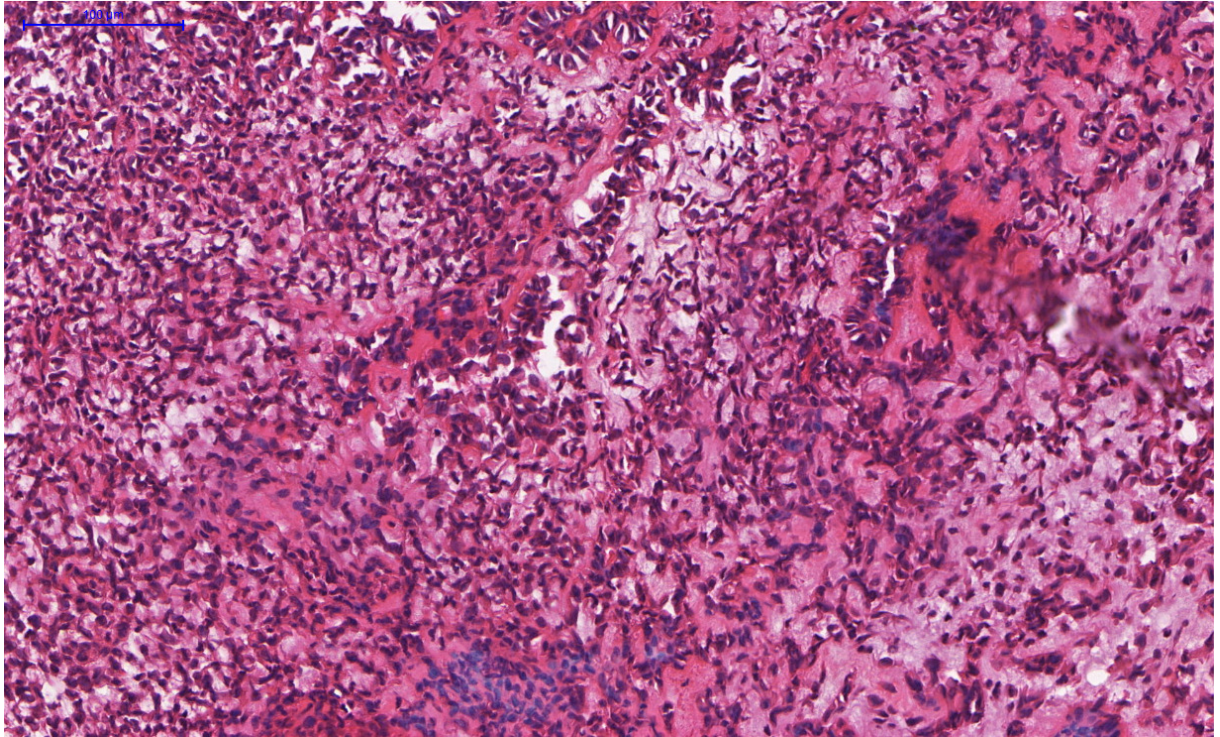


Figura 3. Fotomicrografia evidenciando adenoma pleomórfico do subtipo celular (Pannoramic Viewer, H/E).

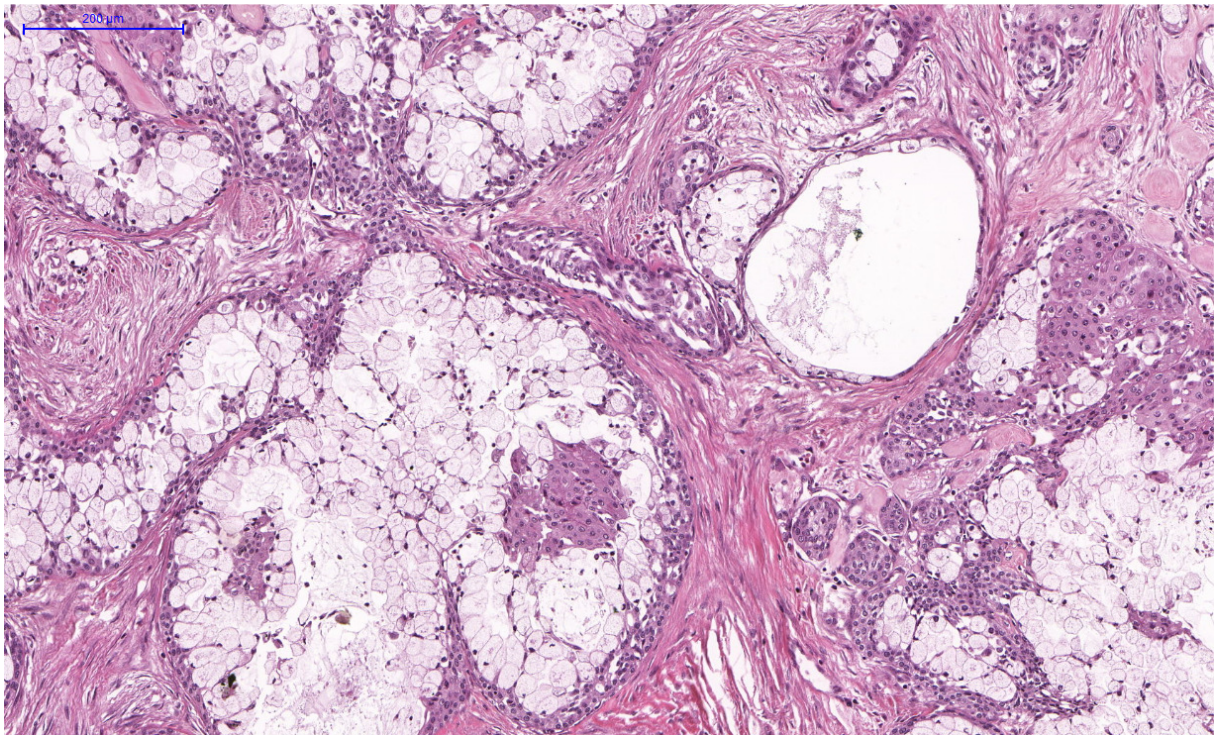


Figura 4. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de baixo grau de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E).

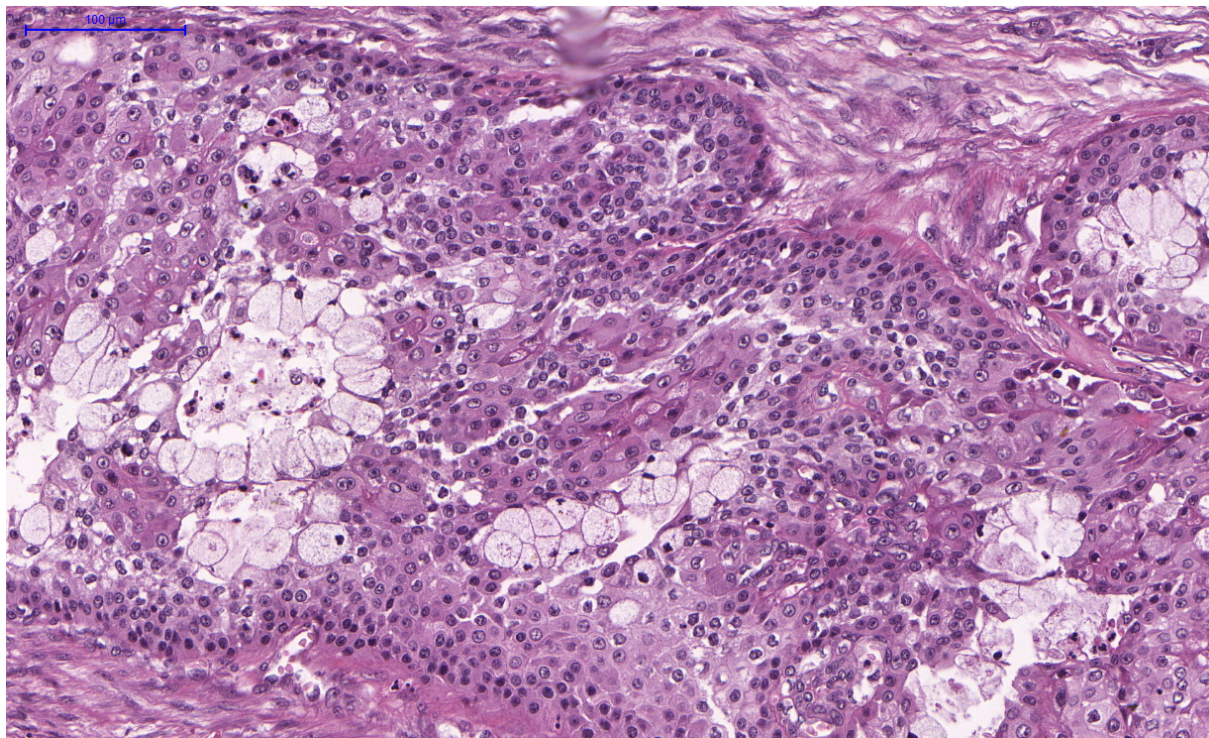


Figura 5. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E).

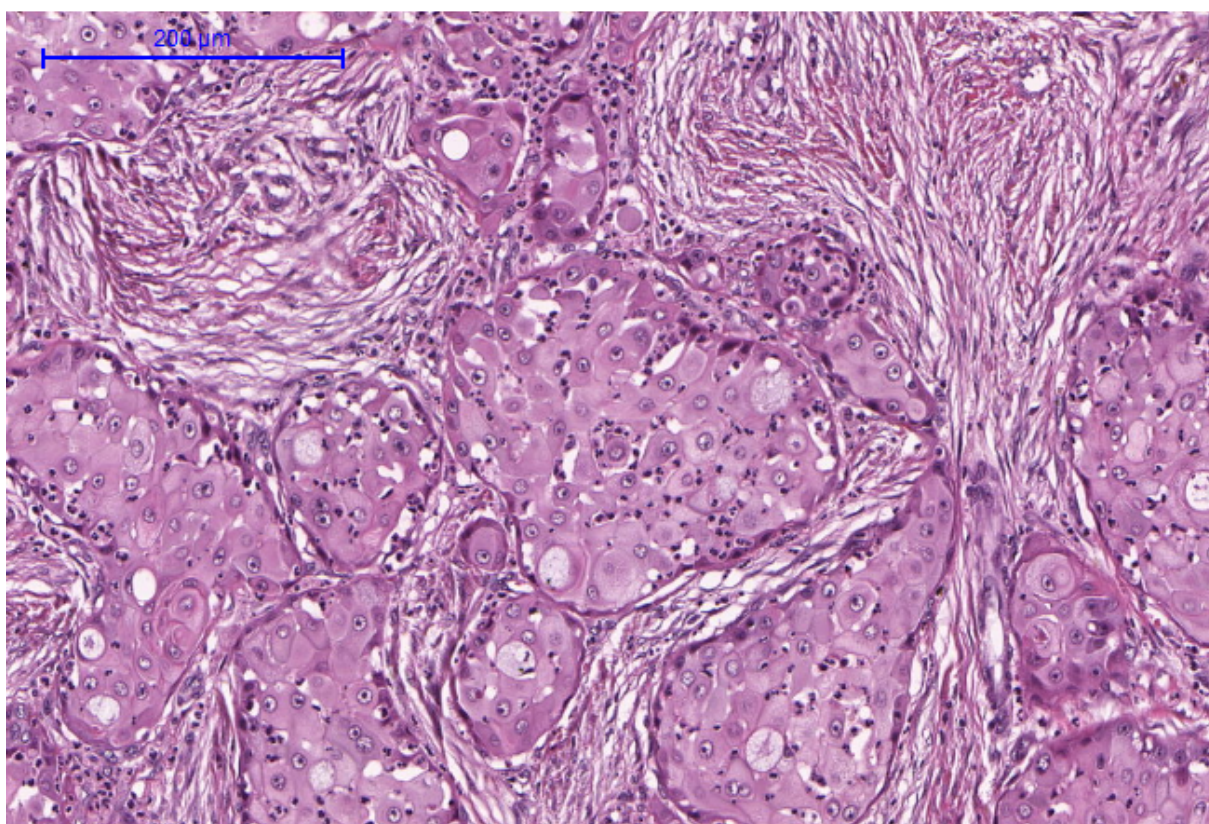


Figura 6. Fotomicrografia evidenciando carcinoma mucoepidermóide de alto grau de malignidade (Pannoramic Viewer, H/E).

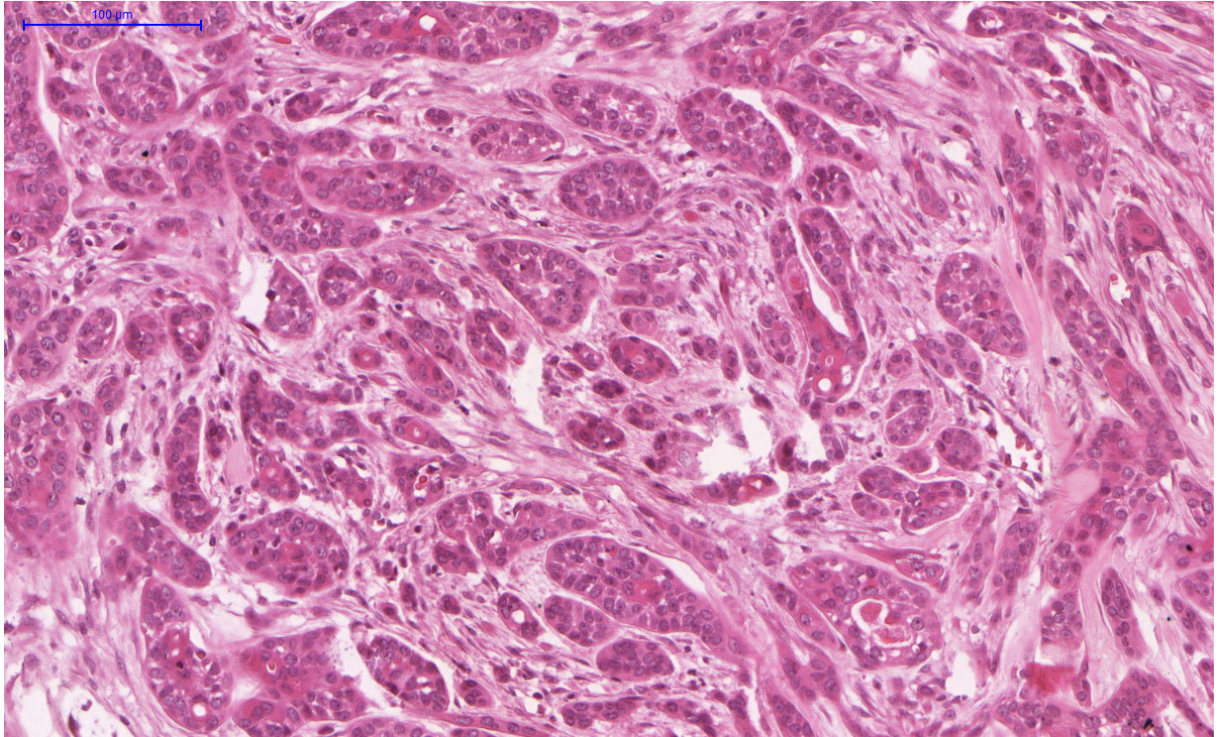


Figura 7. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão tubular (Pannoramic Viewer, H/E).

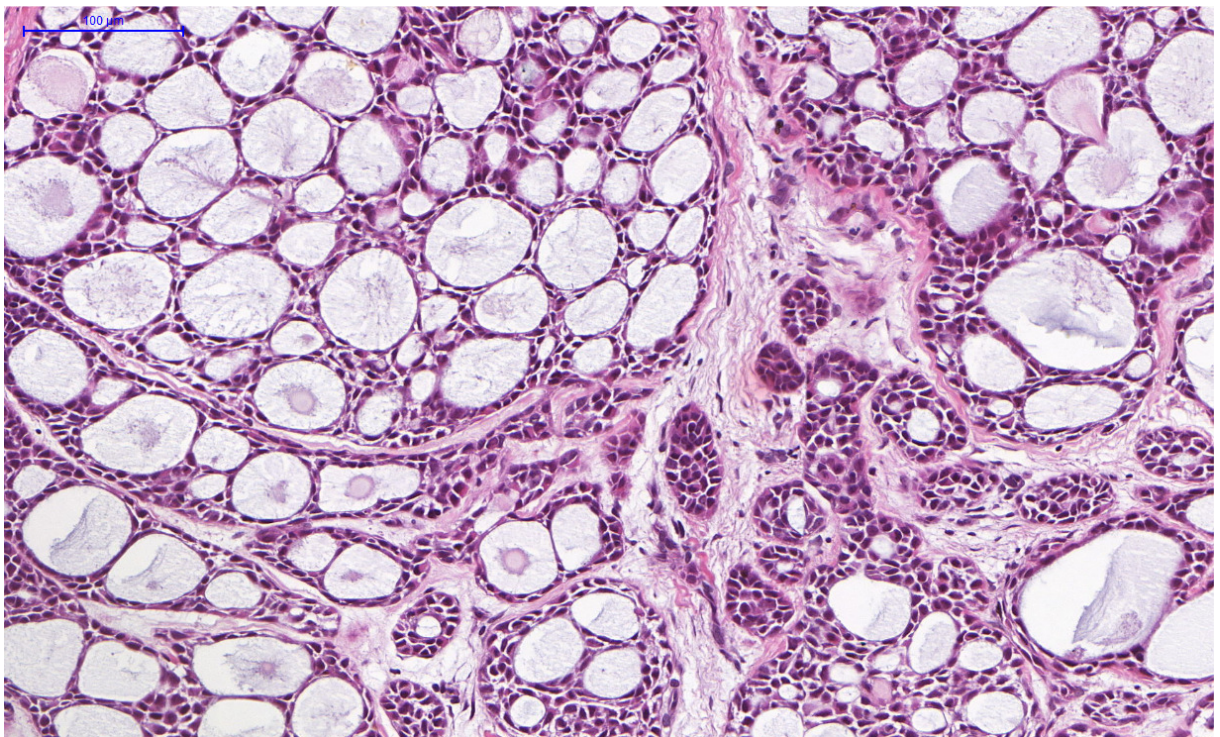


Figura 8. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, H/E).

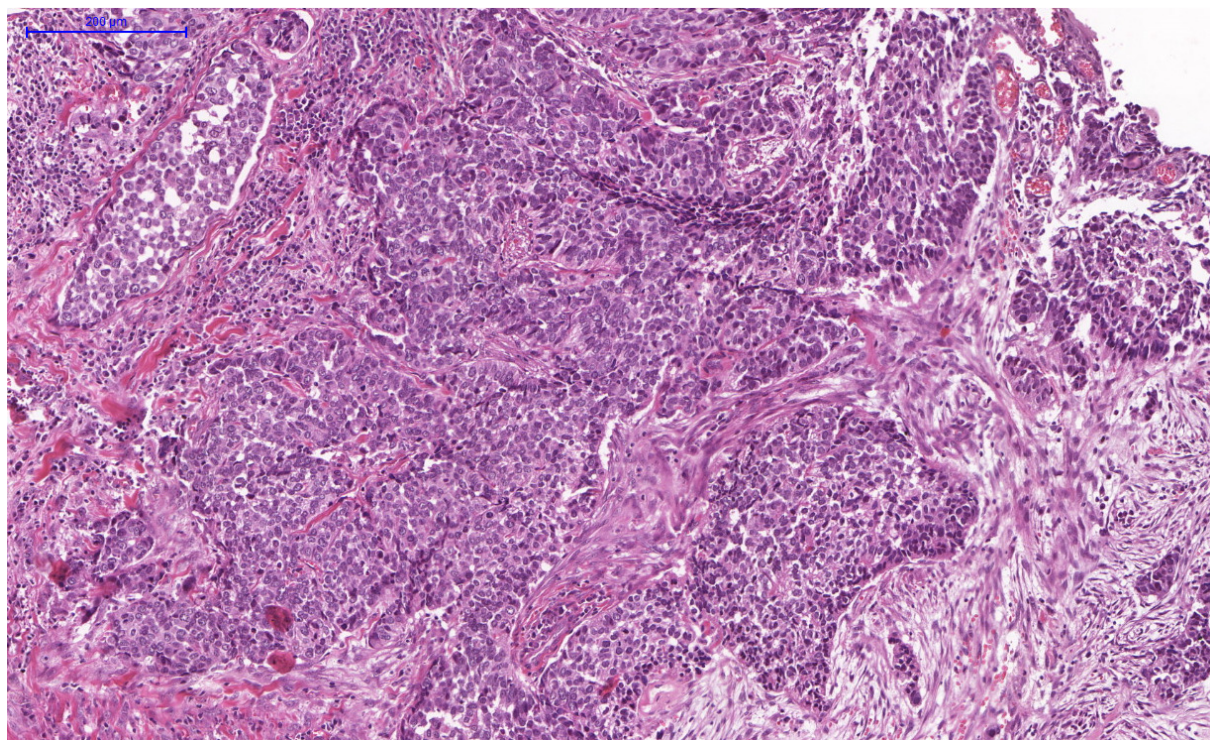


Figura 9. Fotomicrografia evidenciando carcinoma adenóide cístico do padrão sólido (Pannoramic Viewer, H/E).

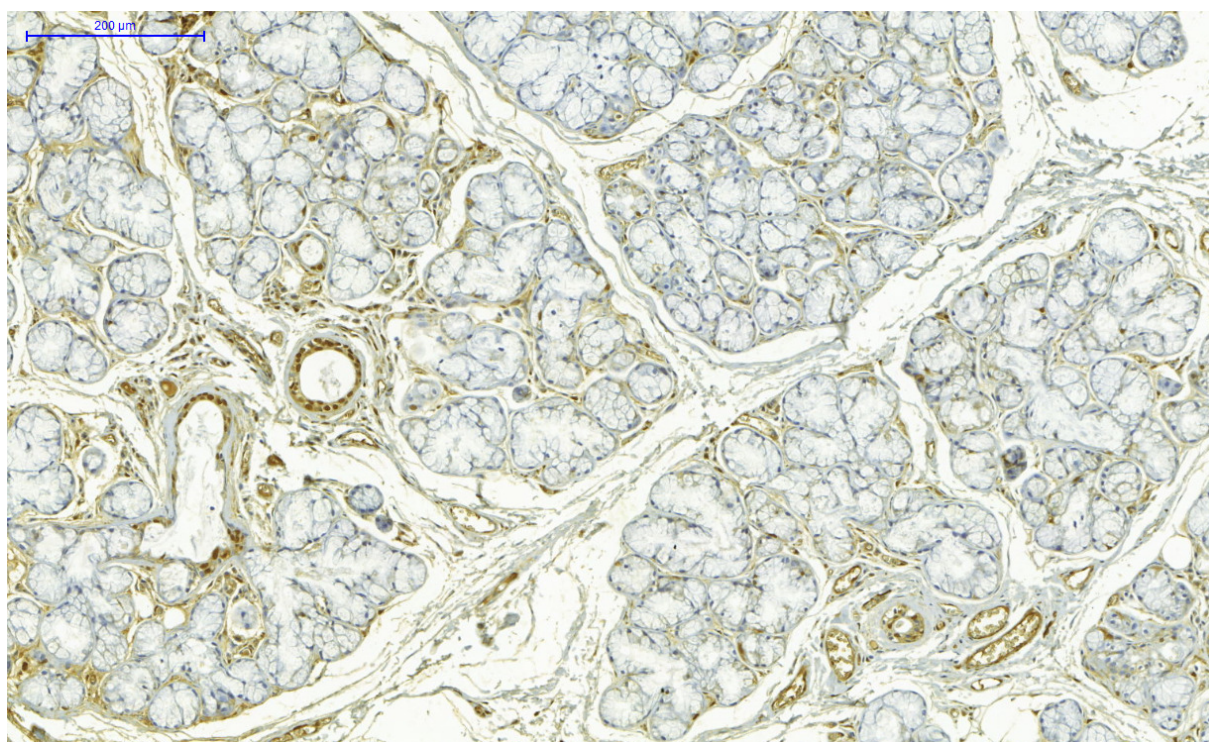


Figura 10. Fotomicrografia evidenciando a marcação pelo VEGF-C em glândula salivar normal (Pannoramic Viewer, Envision).

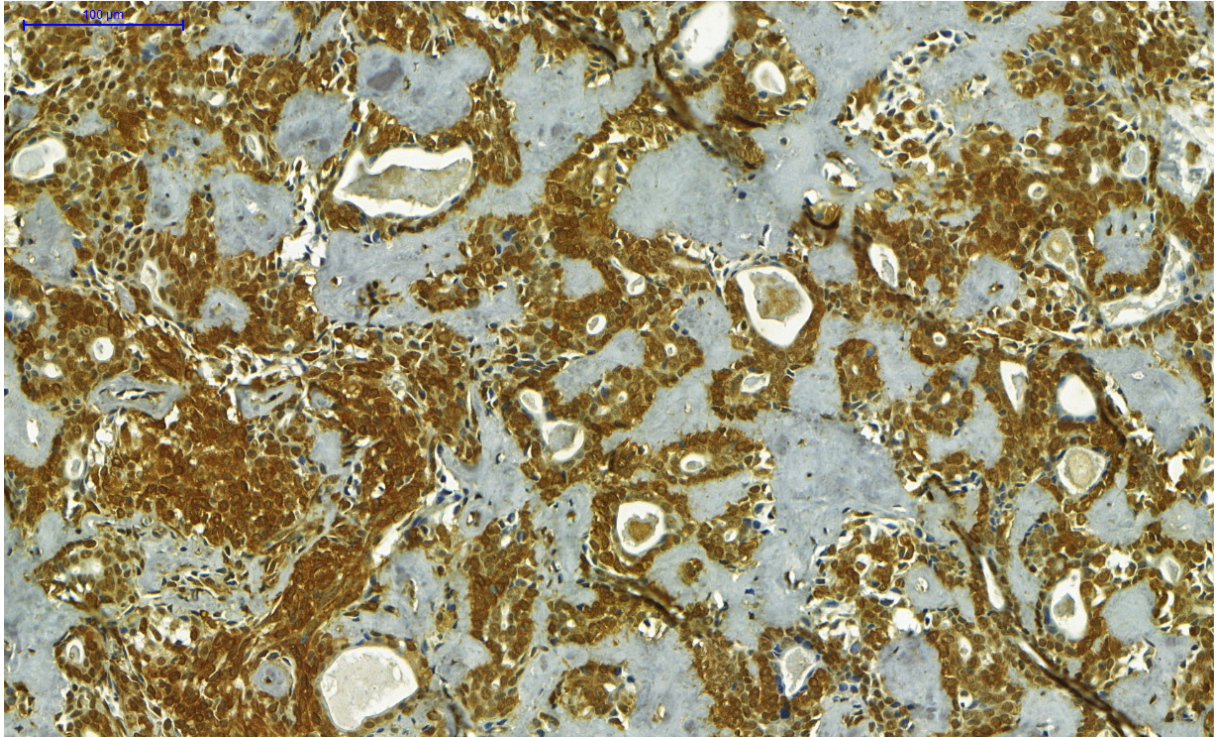


Figura 11. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pleomórfico do tipo clássico (Pannoramic Viewer, Envision).

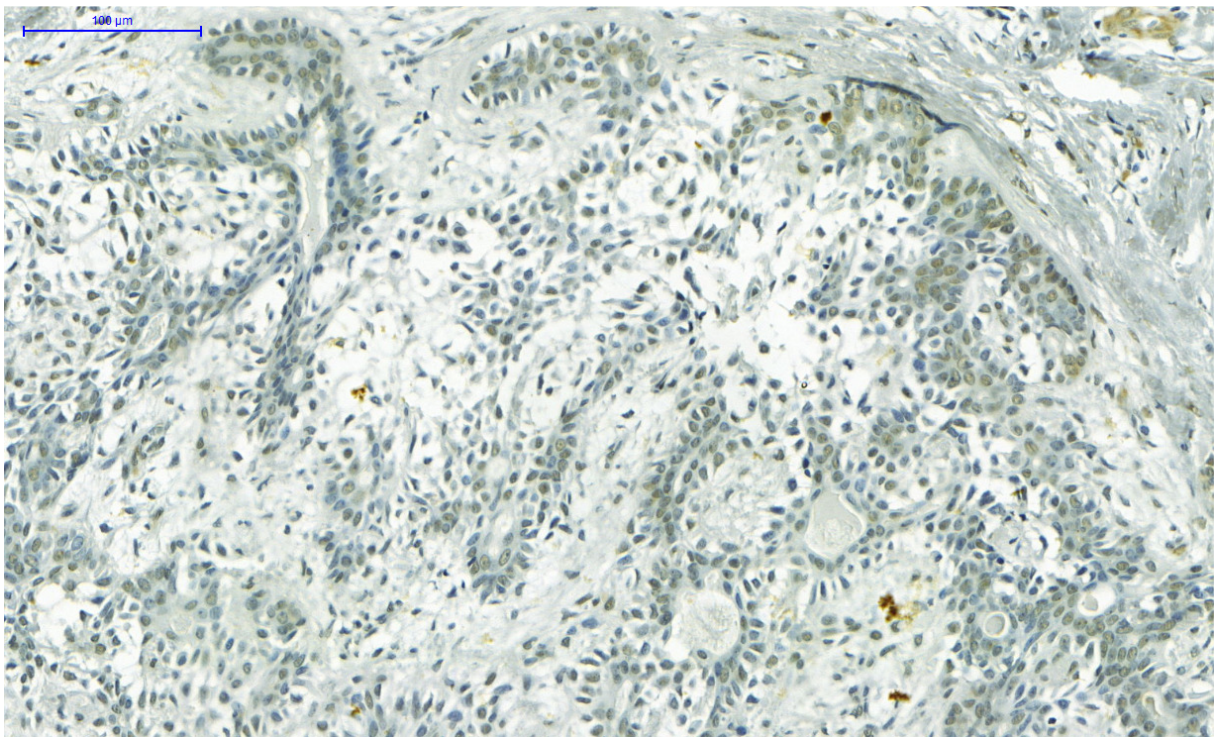


Figura 12. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pelomórfico do tipo mixóide (Pannoramic Viewer, Envision).

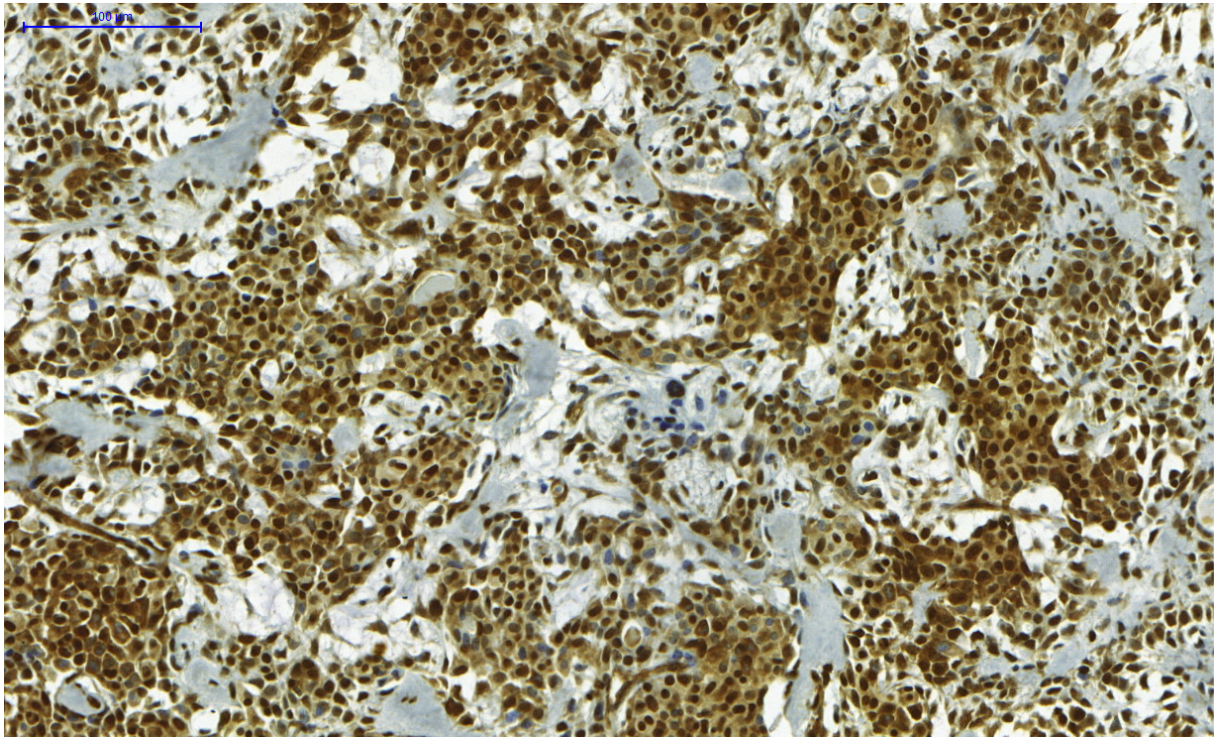


Figura 13. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em adenoma pelomórfico do tipo celular (Pannoramic Viewer, Envision).

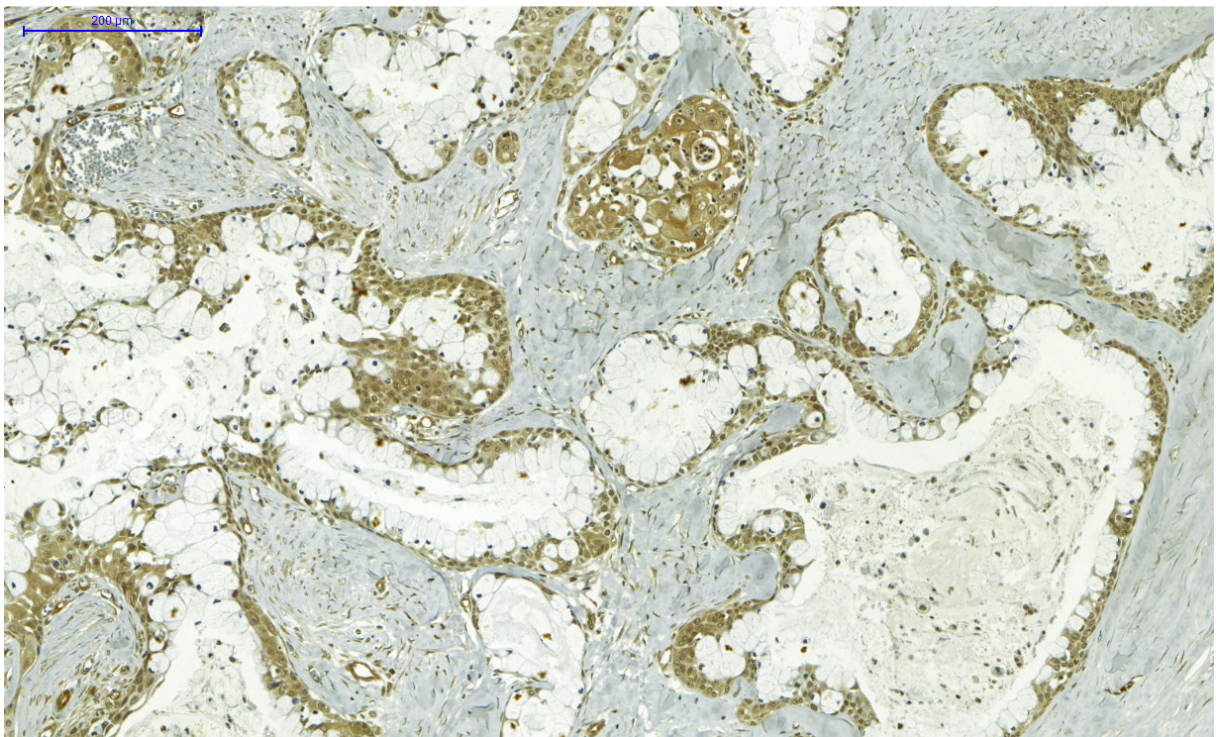


Figura 14. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau (Pannoramic Viewer, Envision).

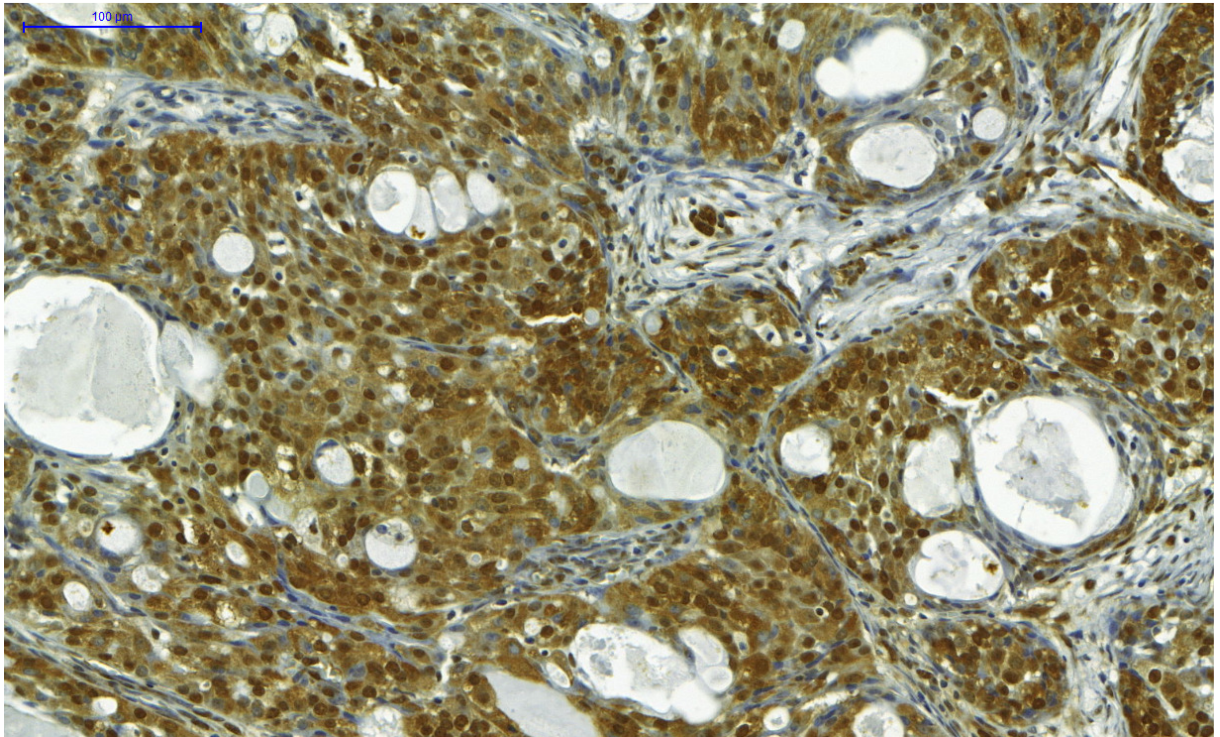


Figura 15. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário (Pannoramic Viewer, Envision).

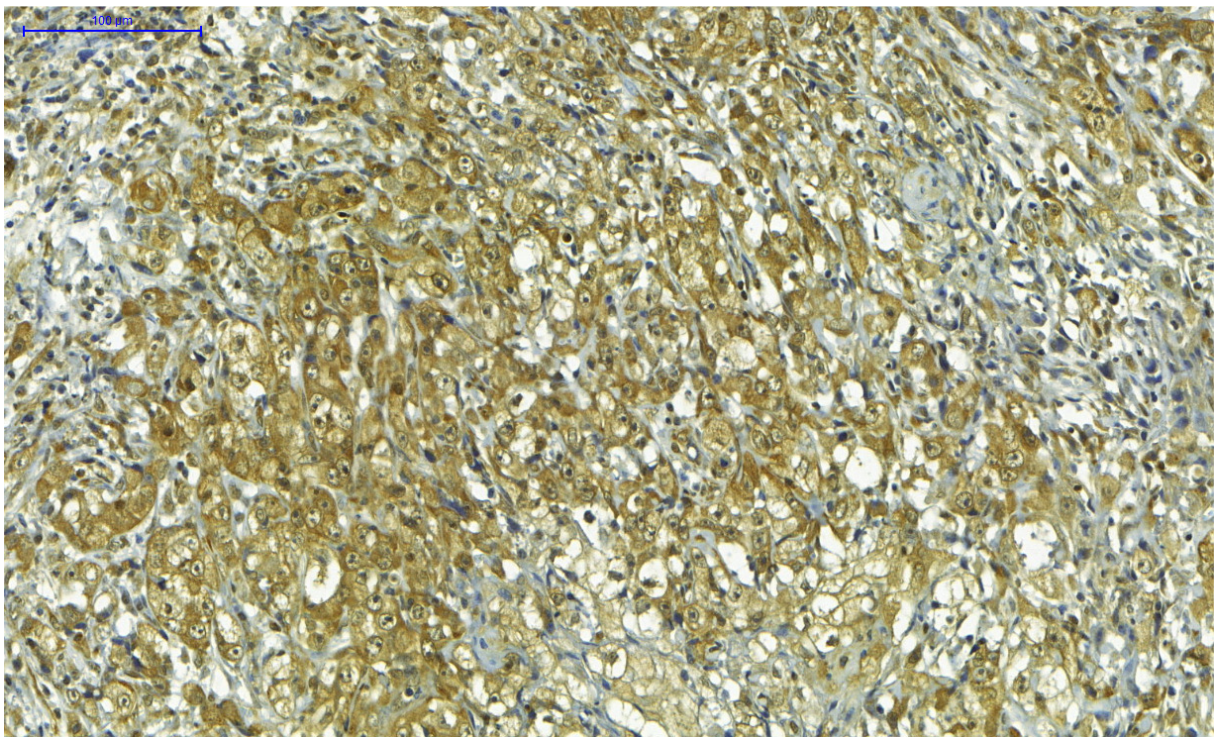


Figura 16. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma mucoepidermóide de alto grau (Pannoramic Viewer, Envision).

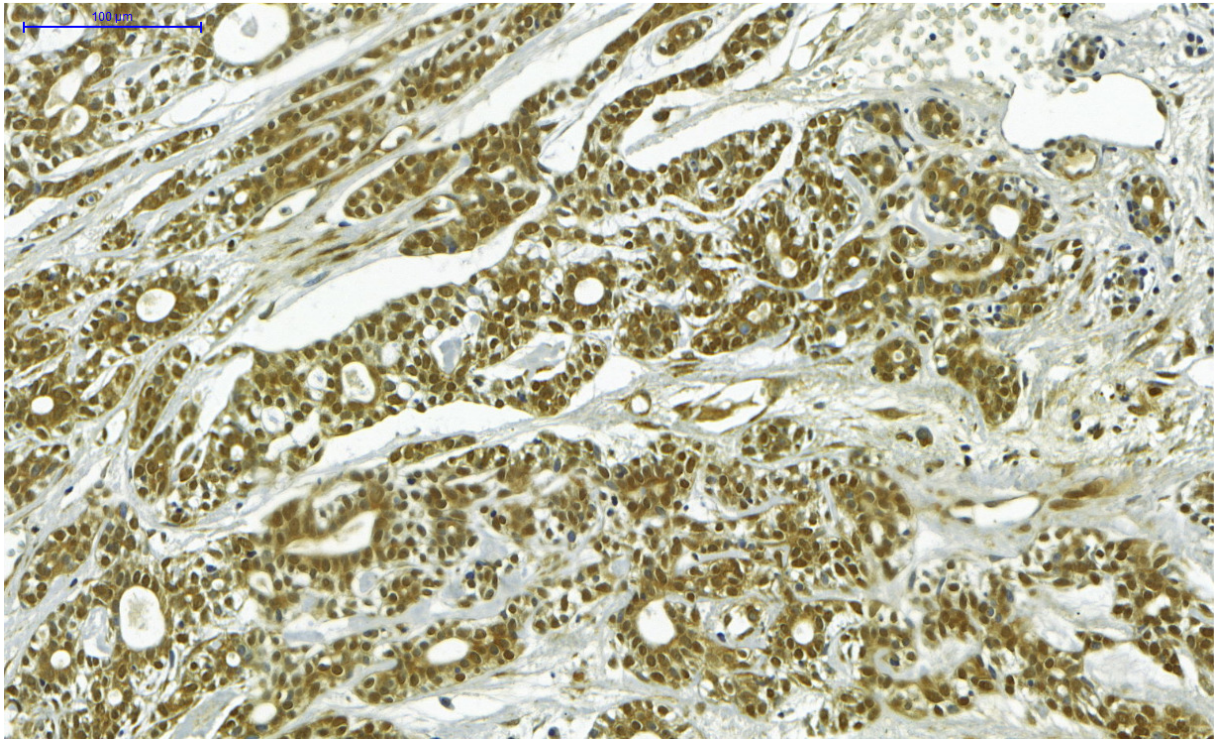


Figura 17. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão tubular (Pannoramic Viewer, Envision).

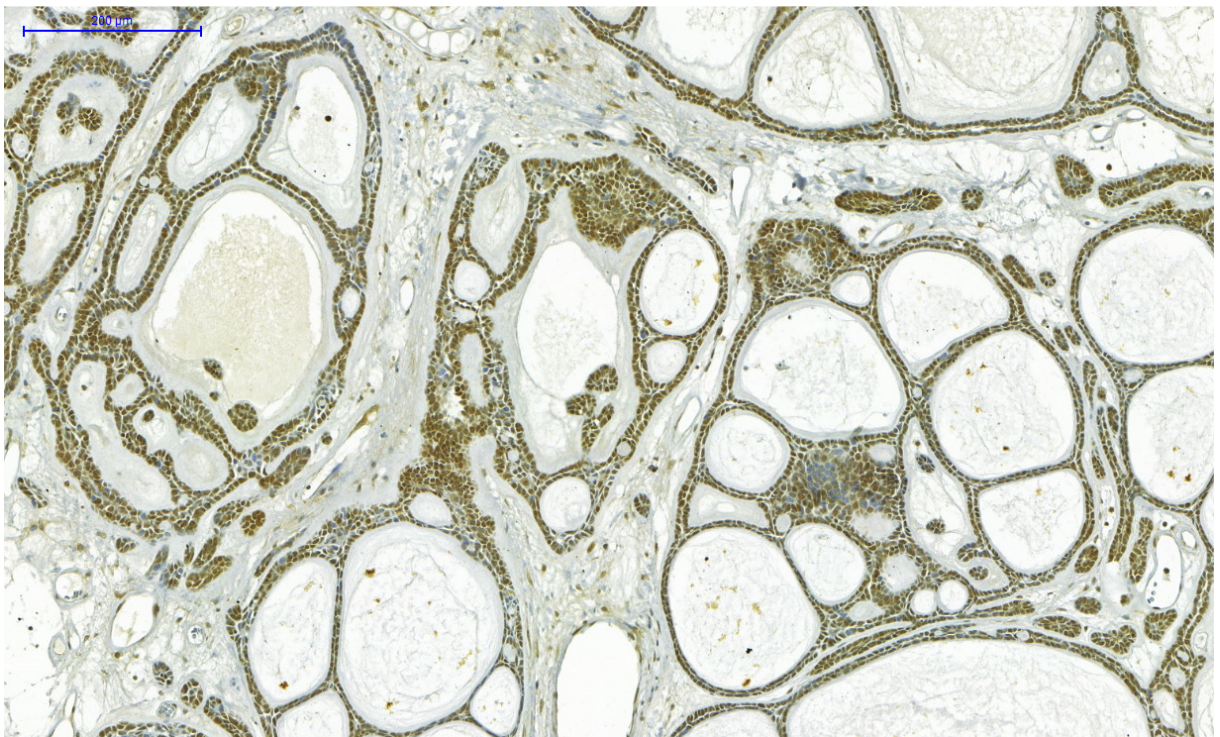


Figura 18. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, Envision).

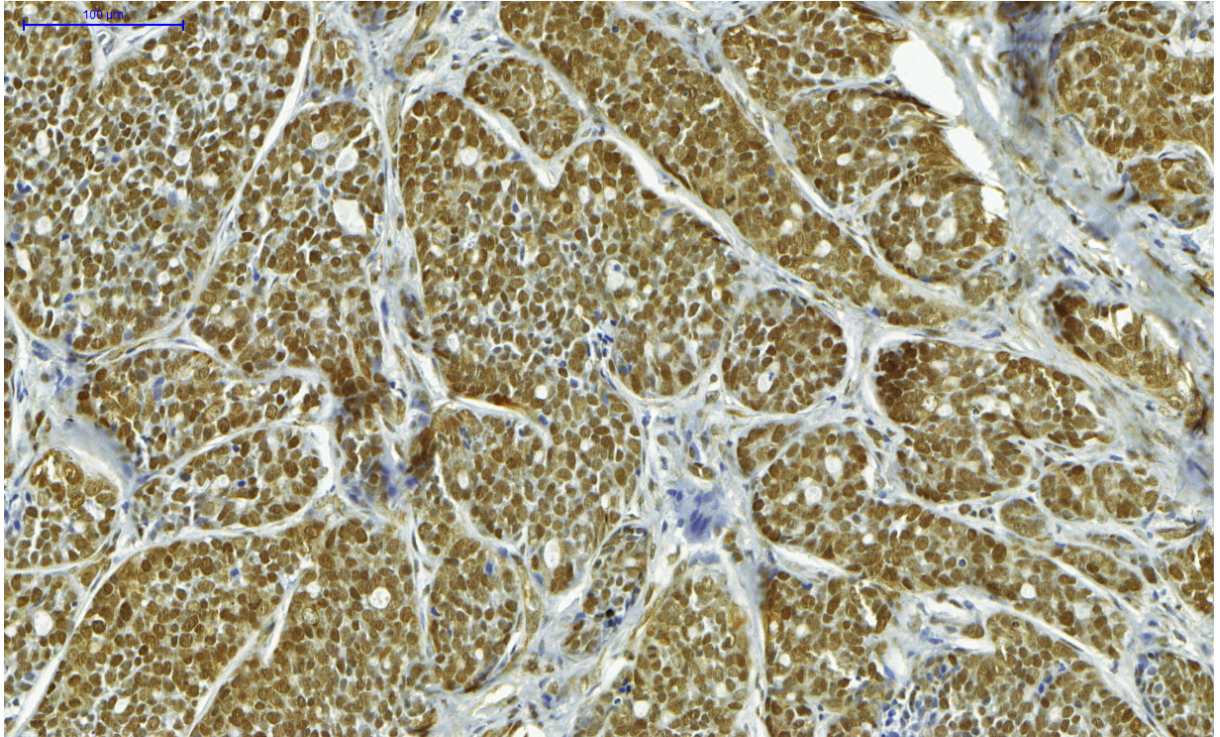


Figura 19. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-C em carcinoma adenóide cístico do padrão sólido (Pannoramic Viewer, Envision).

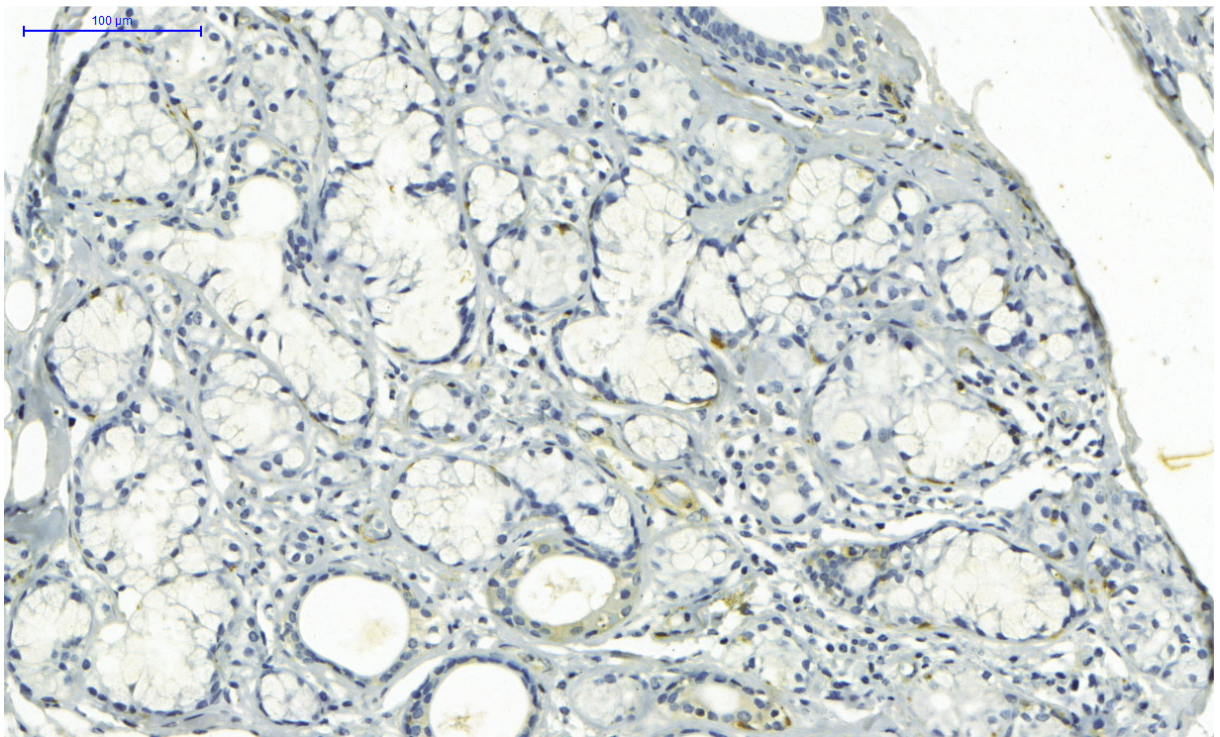


Figura 20. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em glândula salivar normal (Pannoramic Viewer, Envision).

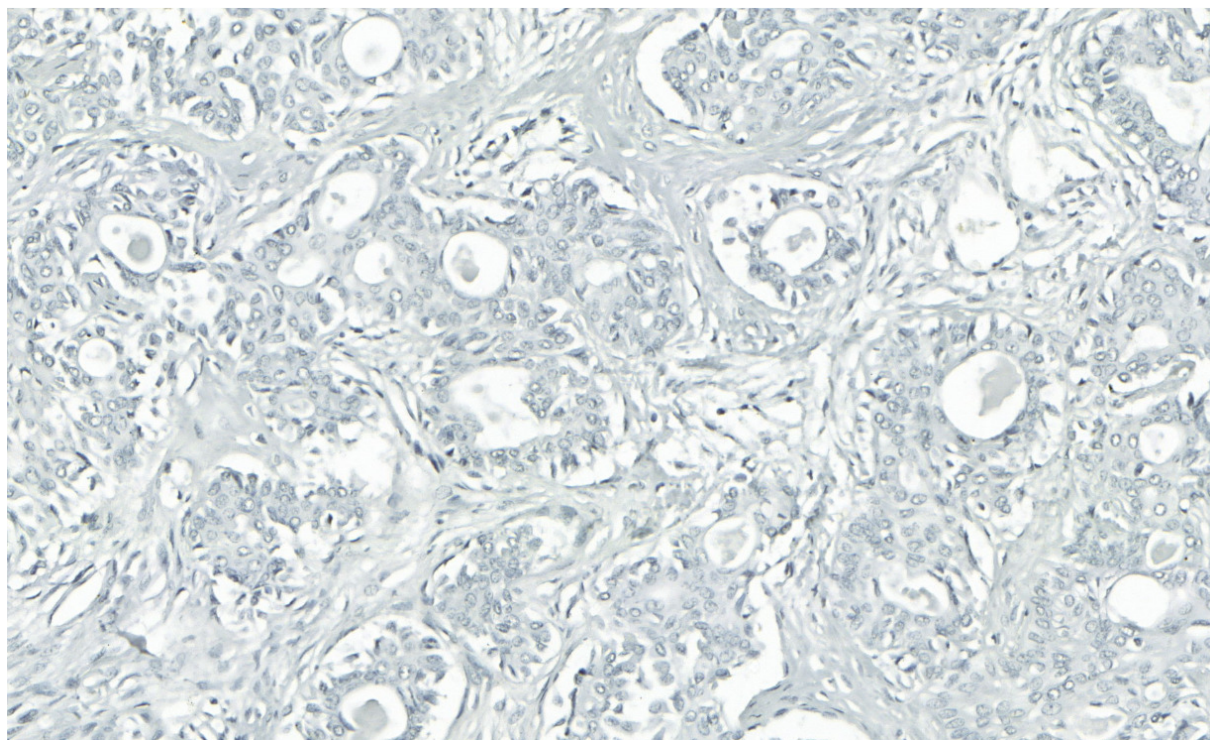


Figura 21. Fotomicrografica evidenciando a ausência de marcação para VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo clássico (Pannoramic Viewer, Envision).

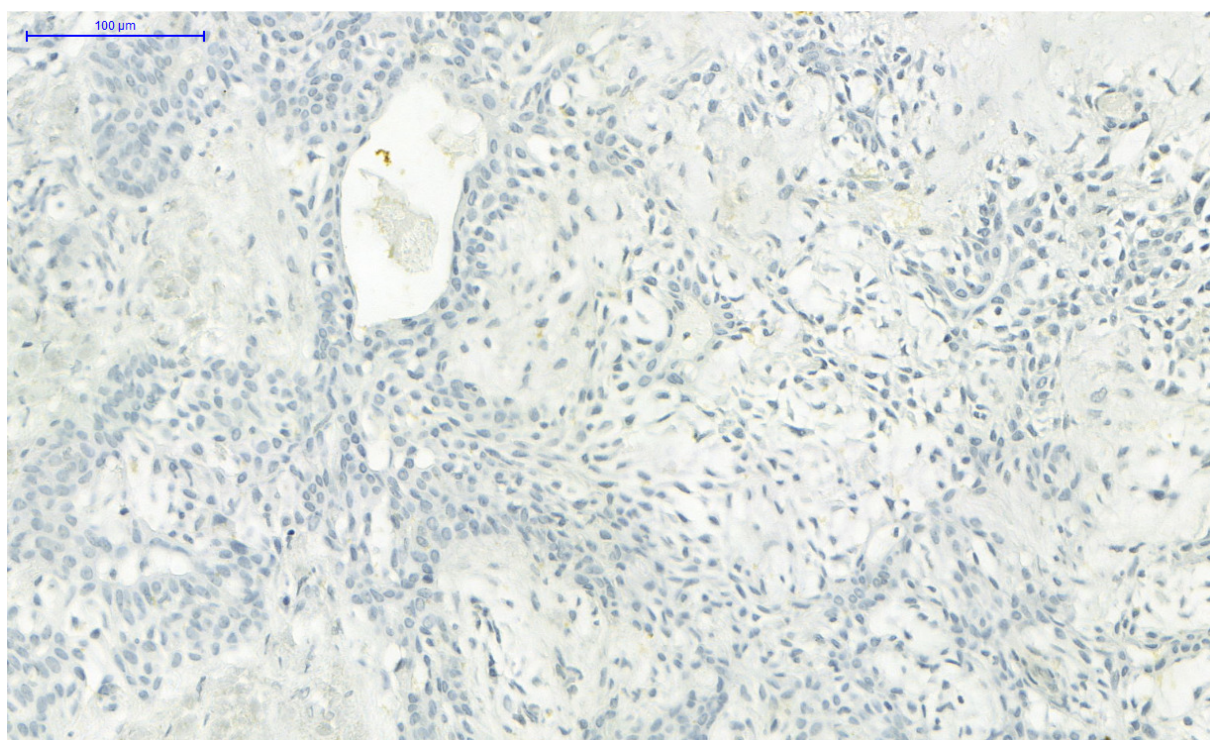


Figura 22. Fotomicrografica evidenciando a ausência de marcação para VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo mixóide (Pannoramic Viewer, Envision).

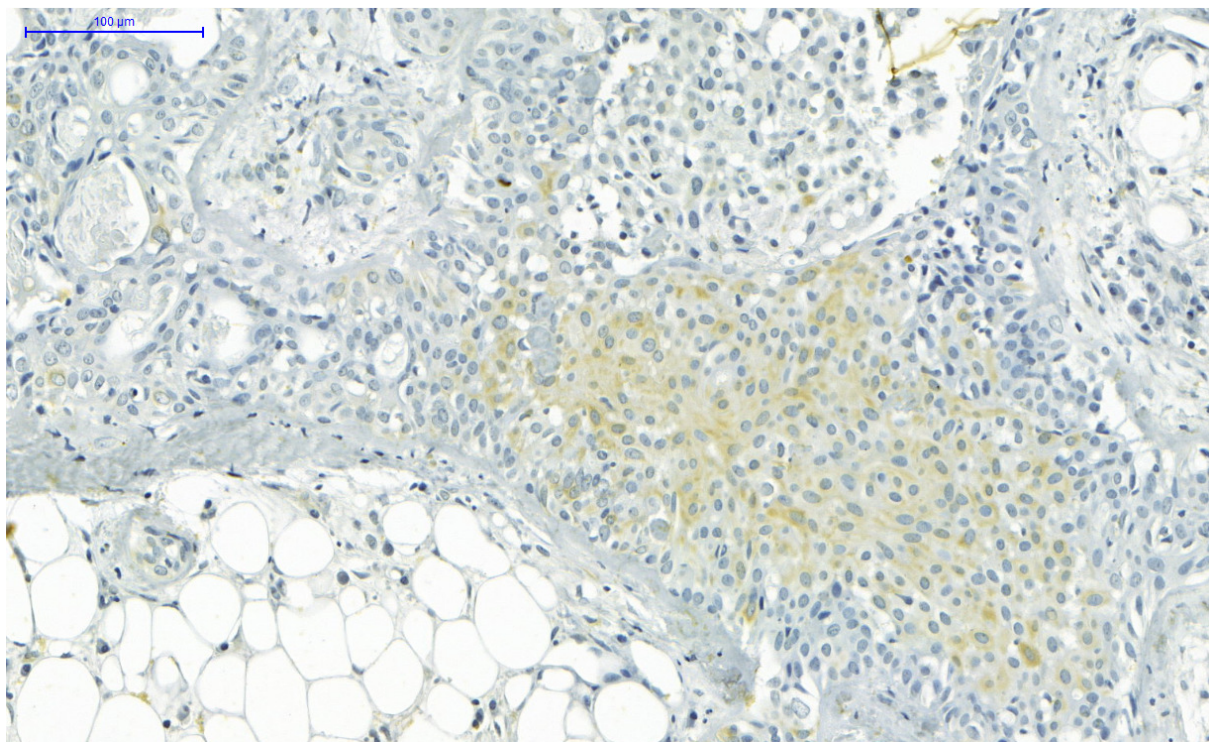


Figura 23. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em adenoma pleomófico do tipo celular (Pannoramic Viewer, Envision).

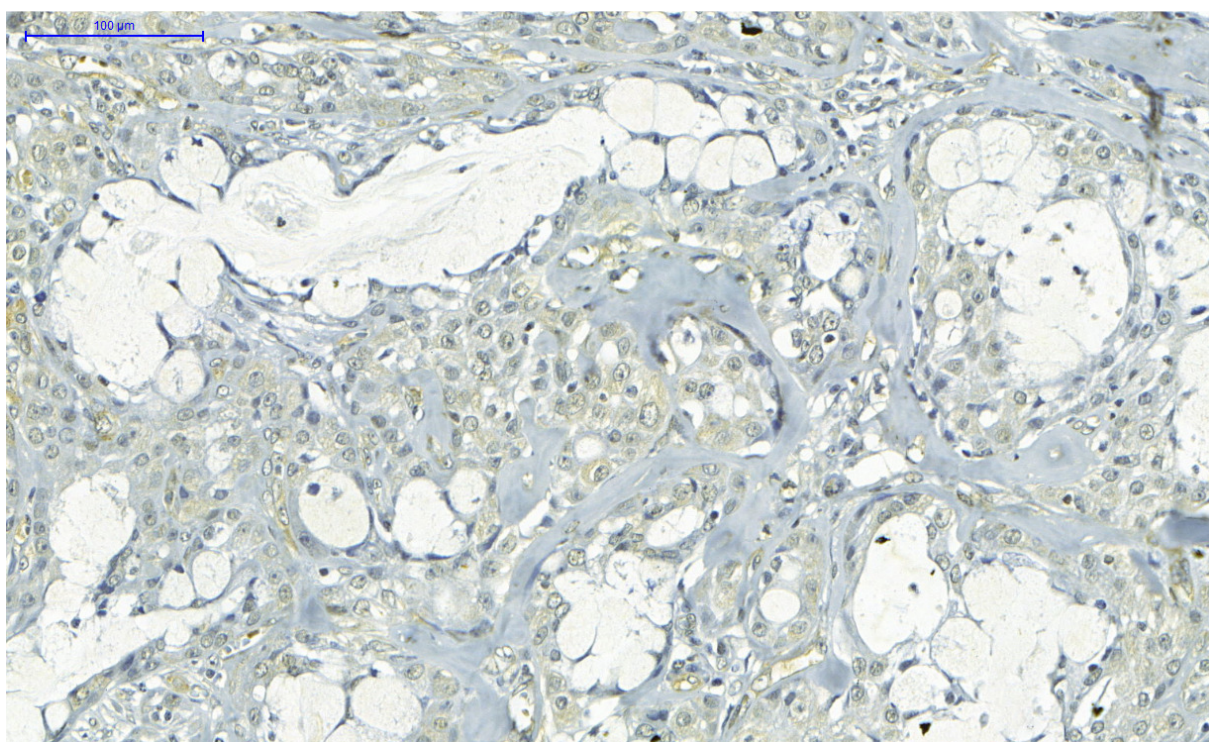


Figura 24. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau (Pannoramic Viewer, Envision).

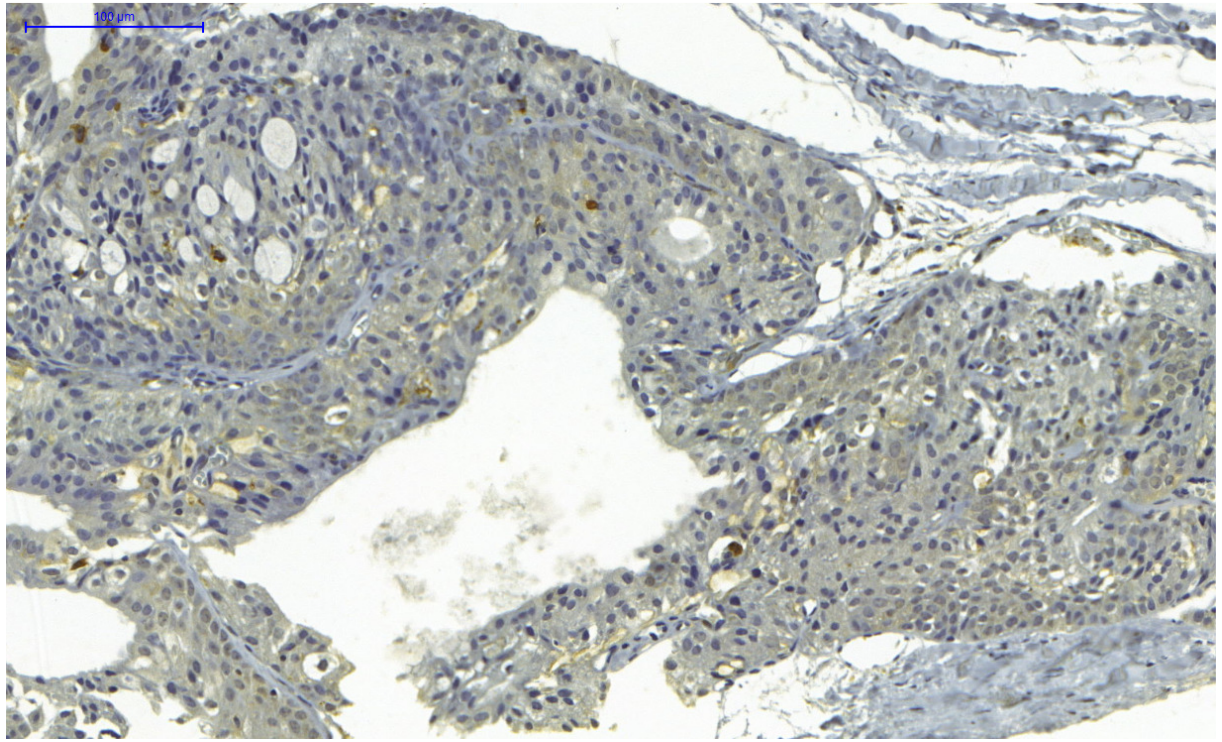


Figura 25. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário (Pannoramic Viewer, Envision).

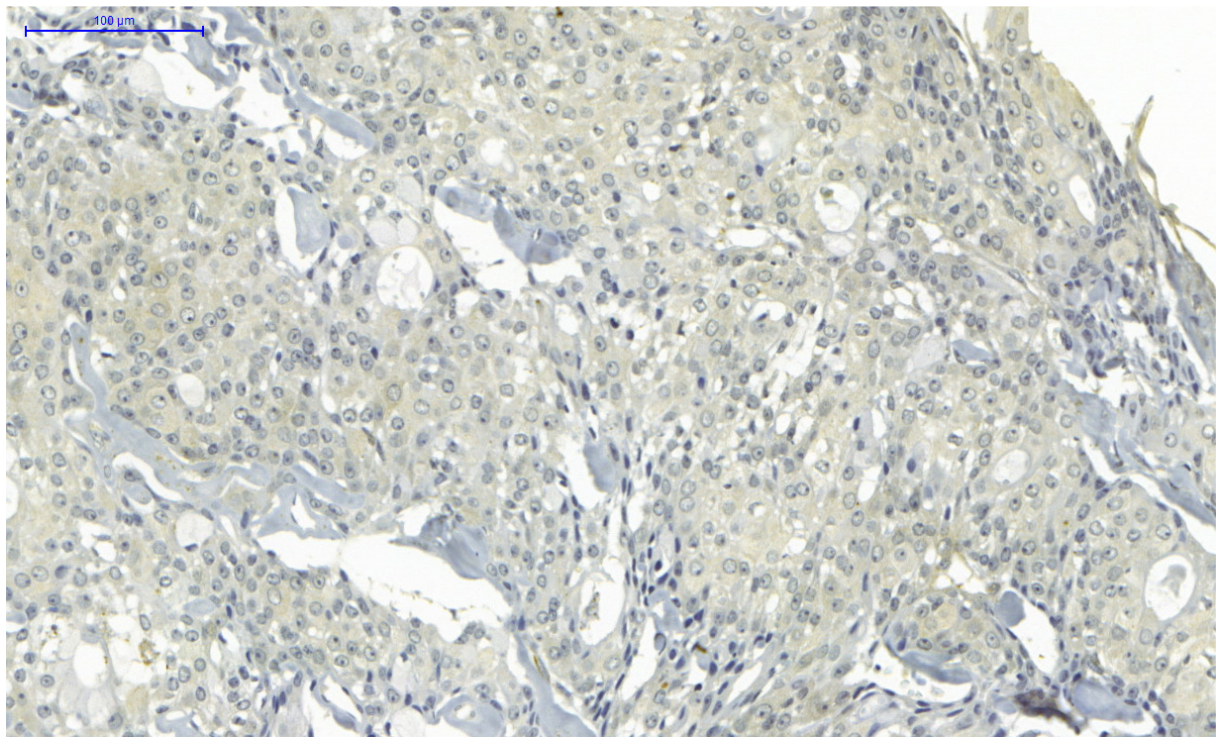


Figura 26. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma mucoepidermóide de alto grau (Pannoramic Viewer, Envision).

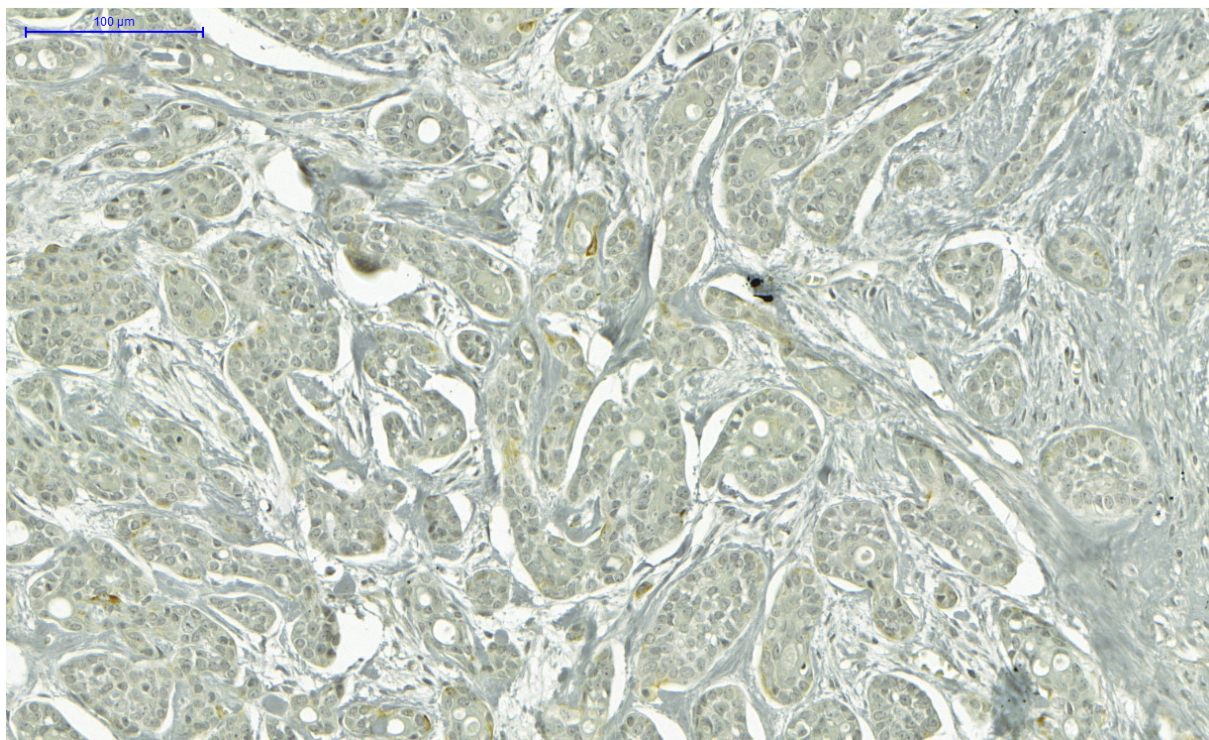


Figura 27. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão tubular (Pannoramic Viewer, Envision).

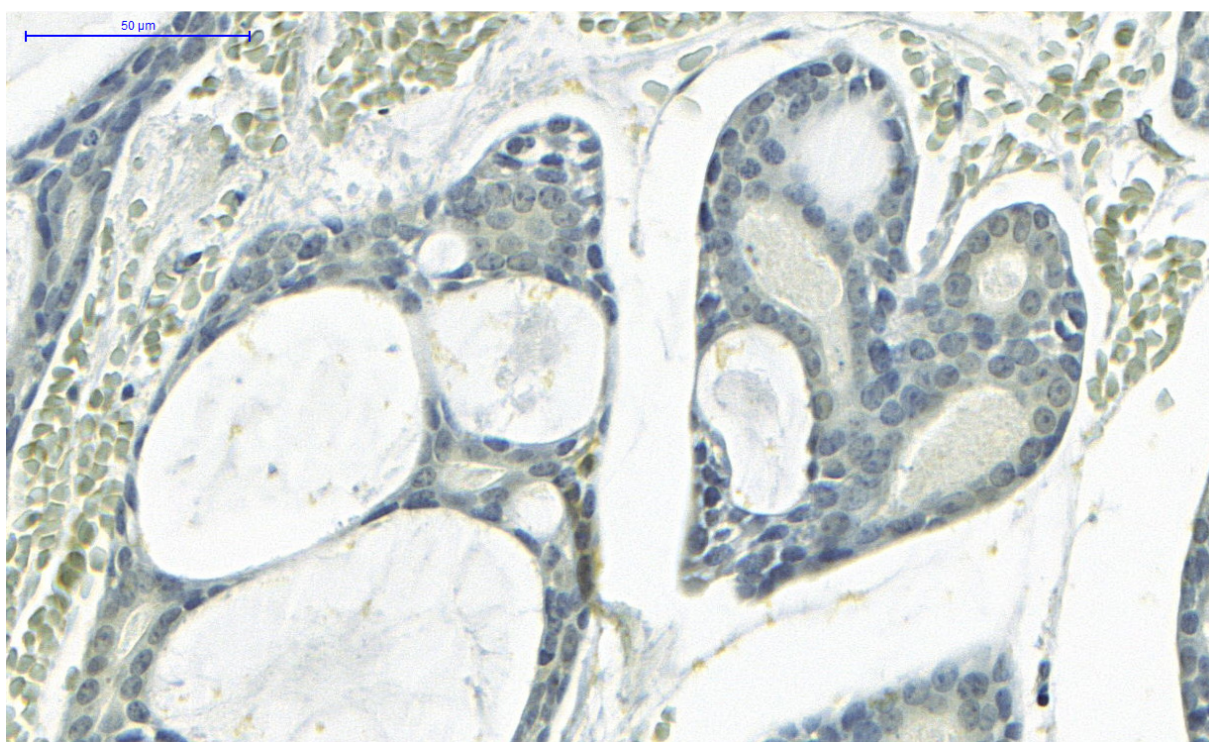


Figura 28. Figura 35. Fotomicrografica evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão cribriforme (Pannoramic Viewer, Envision).

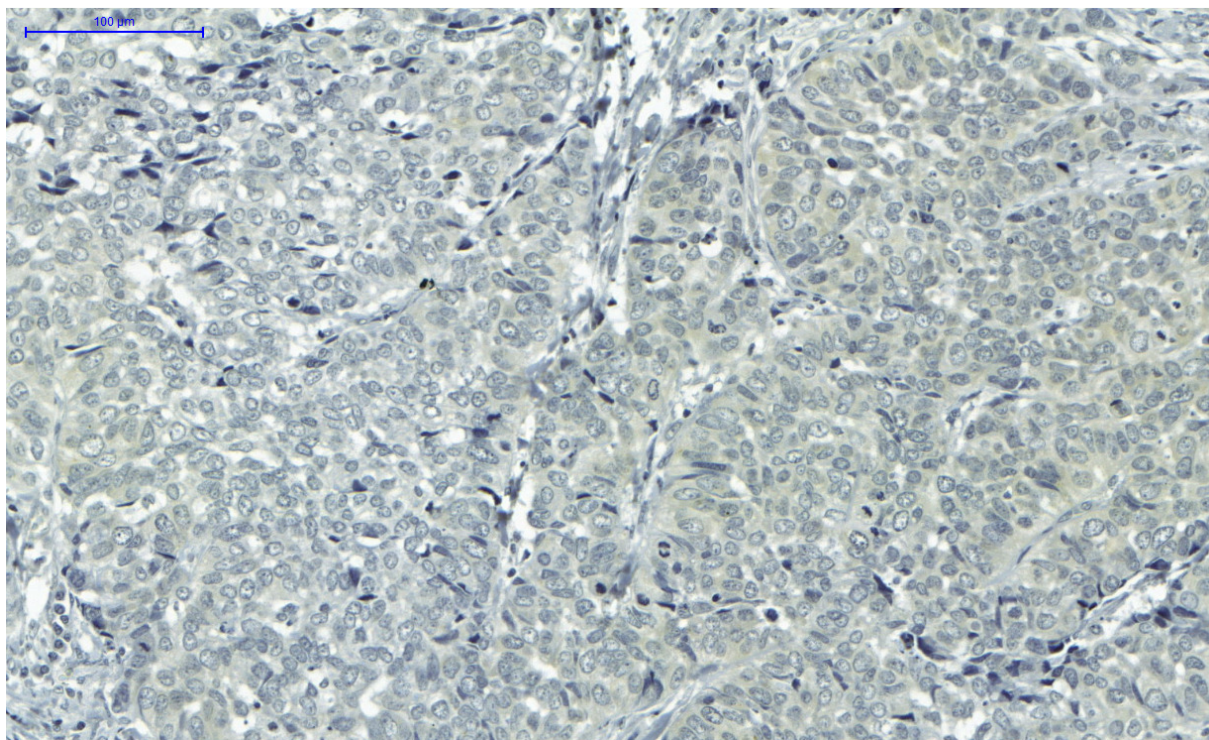


Figura 29. Fotomicrografia evidenciando a marcação pelo VEGF-D em carcinoma adenóide cístico de padrão sólido (Pannoramic Viewer, Envision).

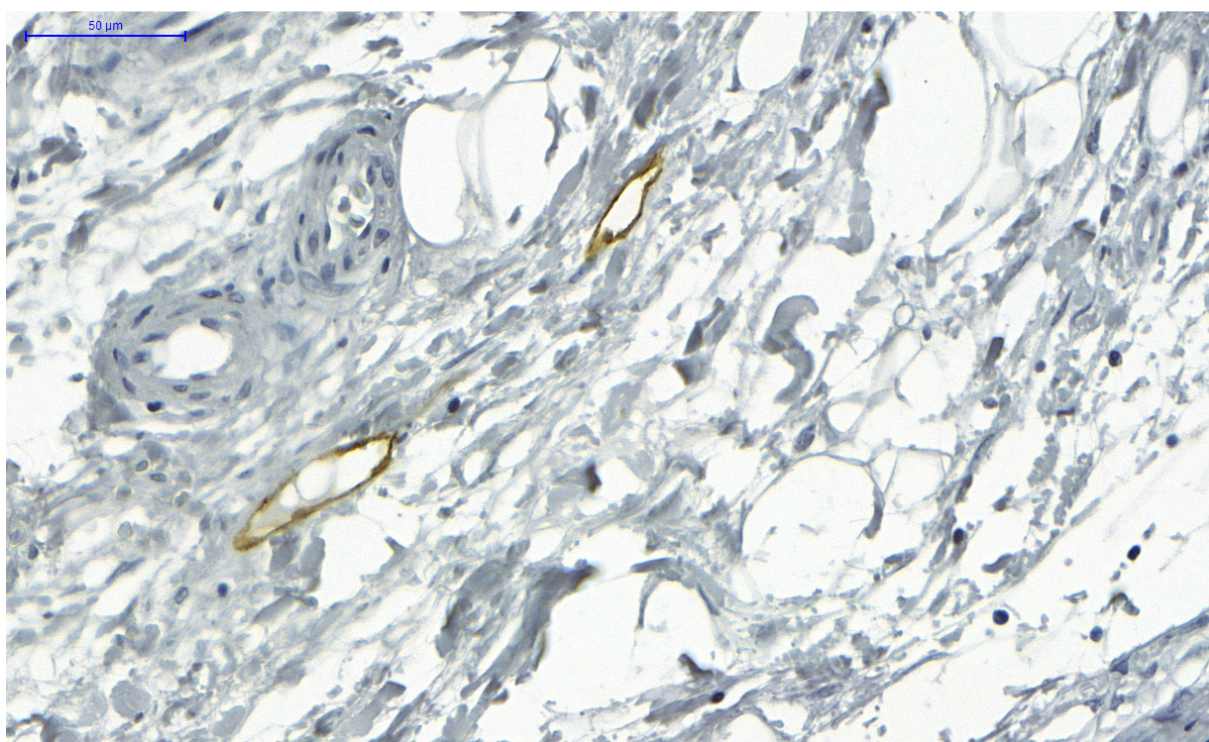


Figura 30. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de adenoma plemórfico (Pannoramic Viewer, Envision).

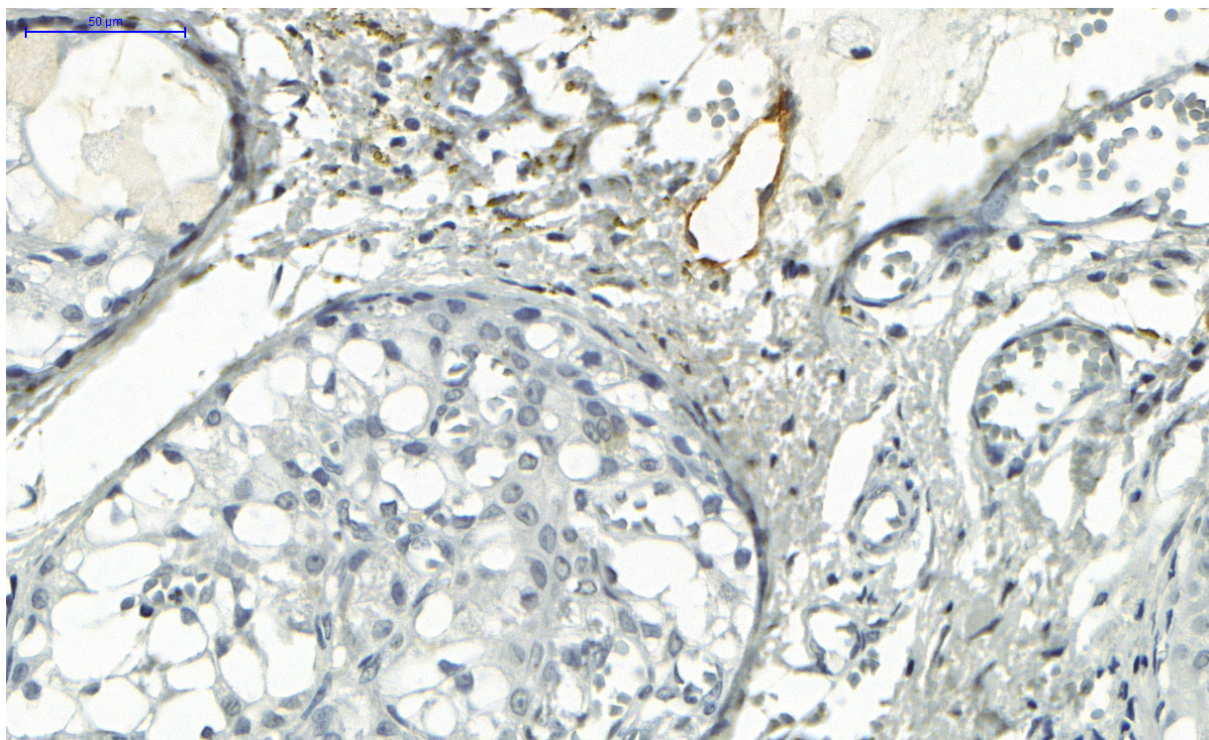


Figura 31. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision).

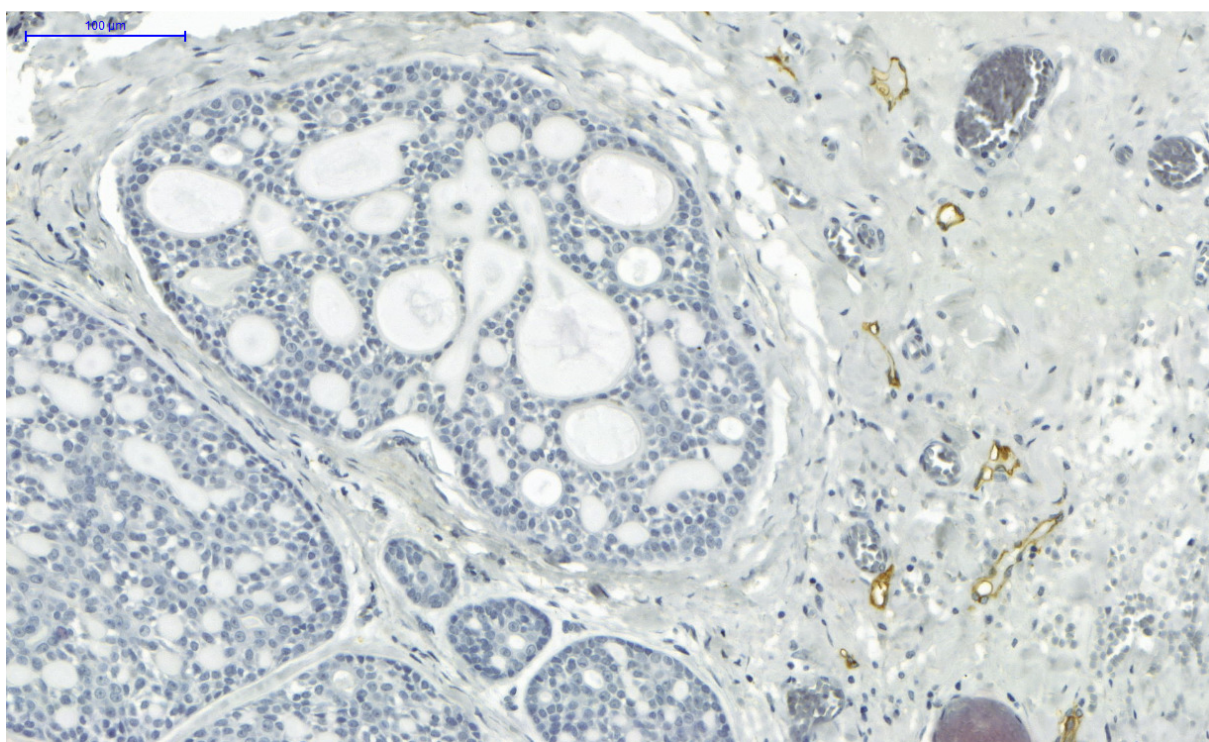


Figura 32. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos peritumorais de carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision).

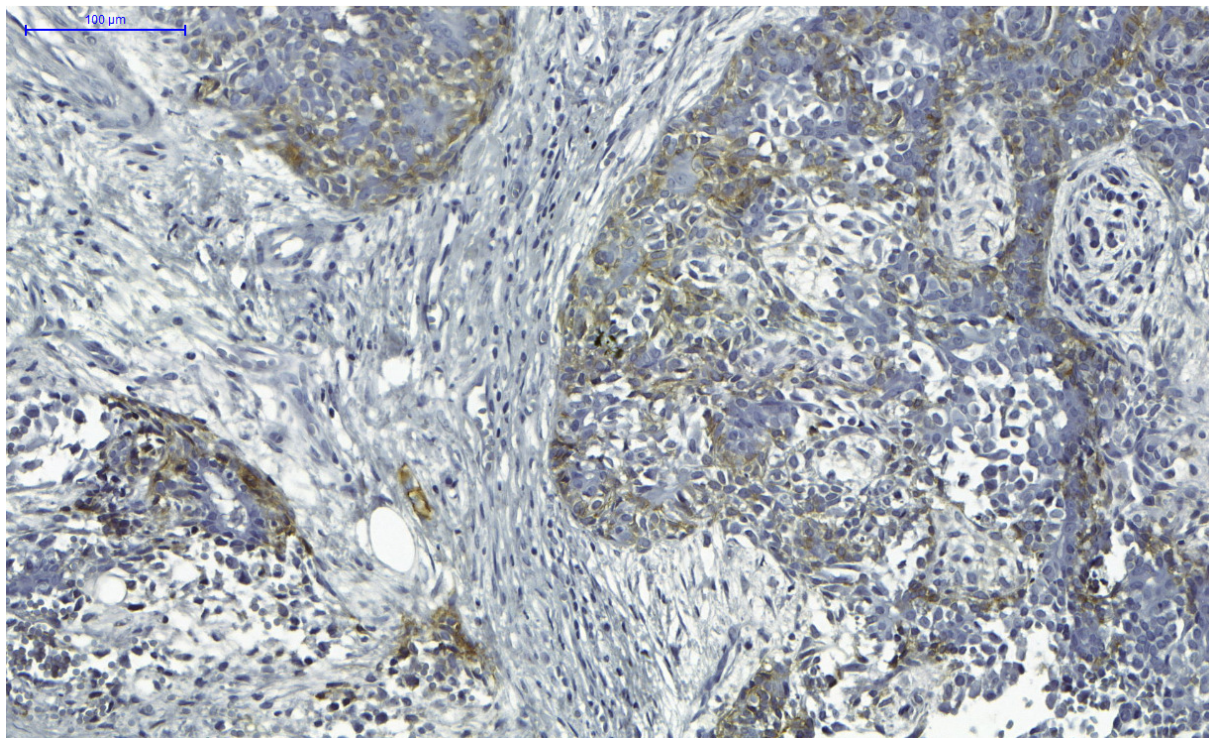


Figura 33. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de adenoma pleomórfico (Pannoramic Viewer, Envision).

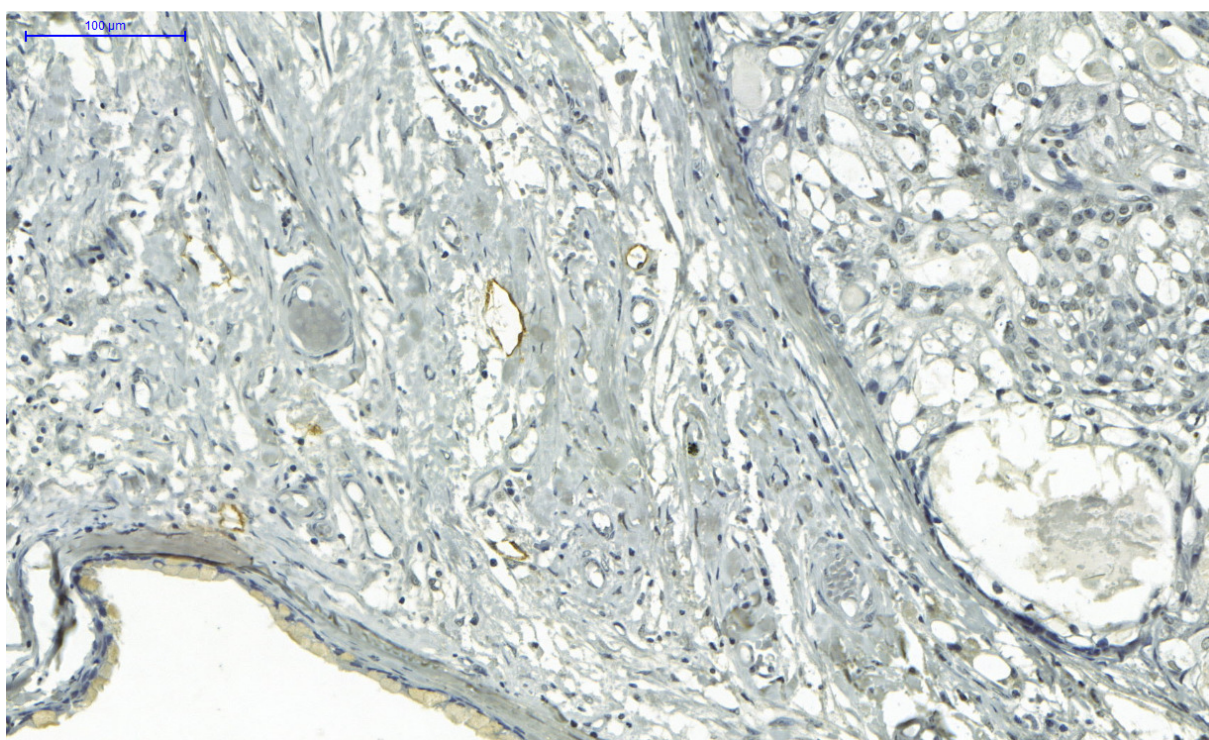


Figura 34. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision).

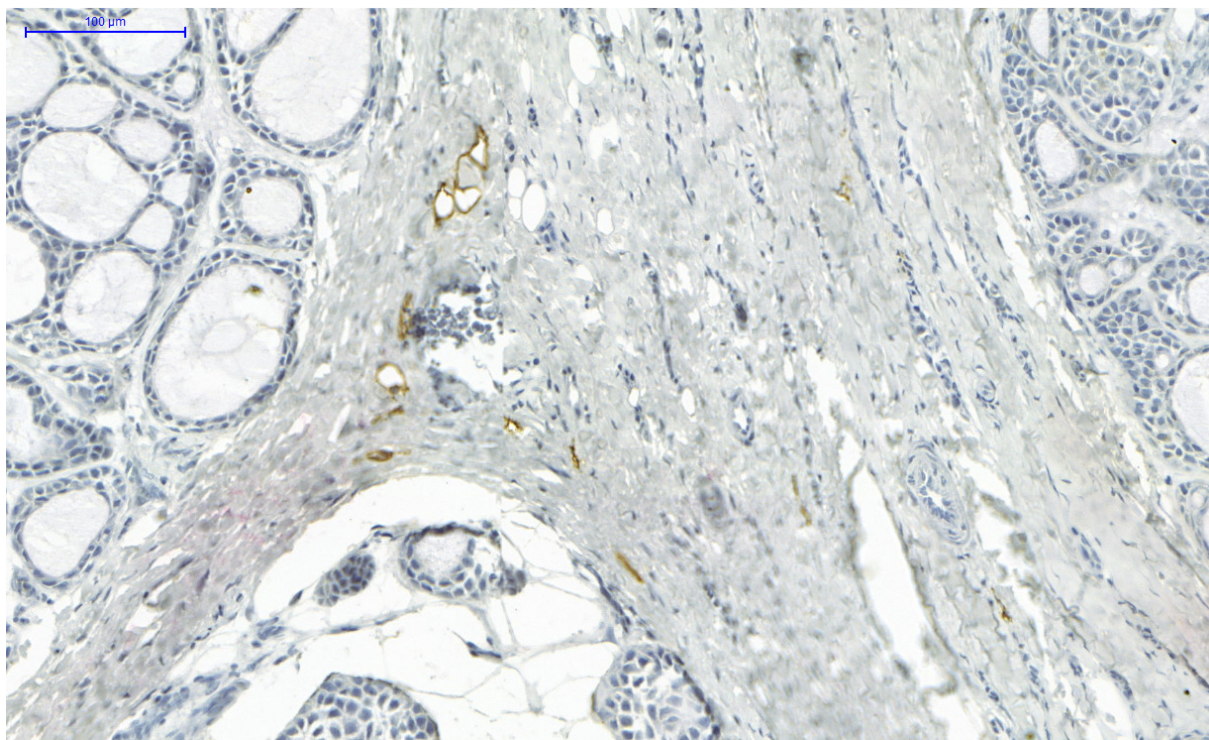


Figura 35. Fotomicrografia evidenciando a imunomarcagem pelo D2-40 nos vasos linfáticos intratumorais de carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision).



Figura 36. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 nos vasos linfáticos (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain).

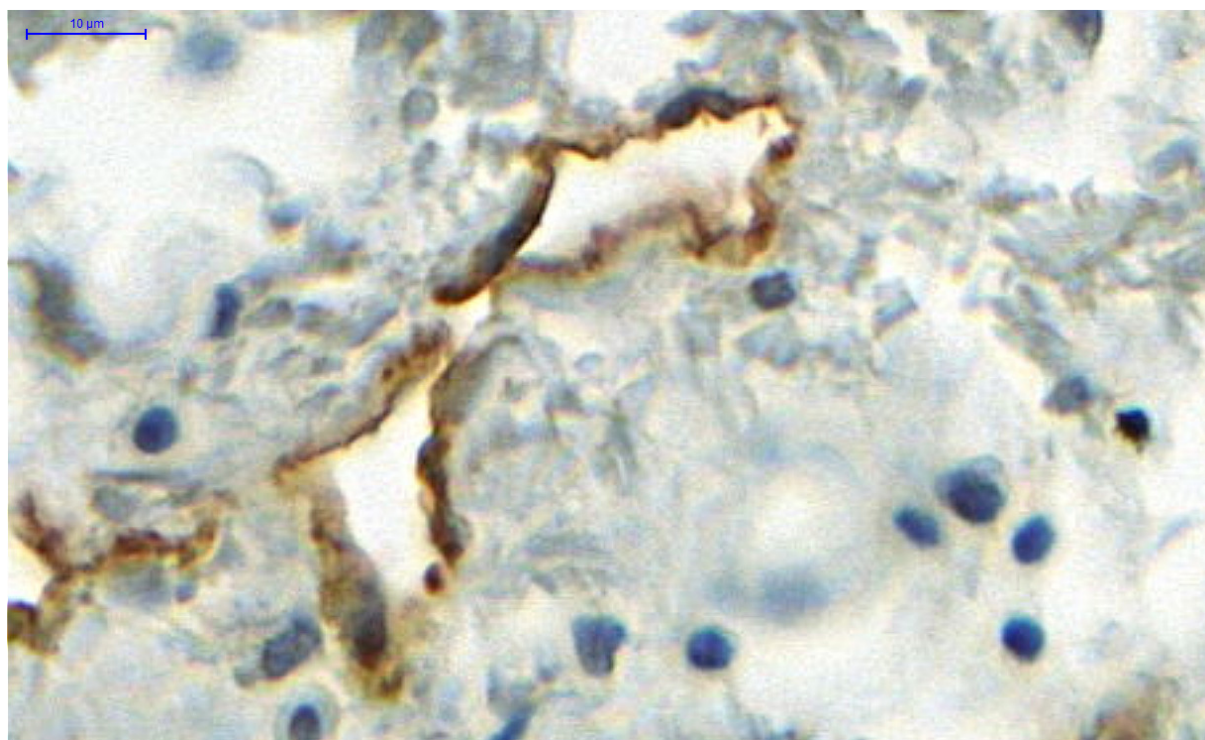


Figura 37. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 nos vasos linfáticos do adenoma pleomórfico (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain).

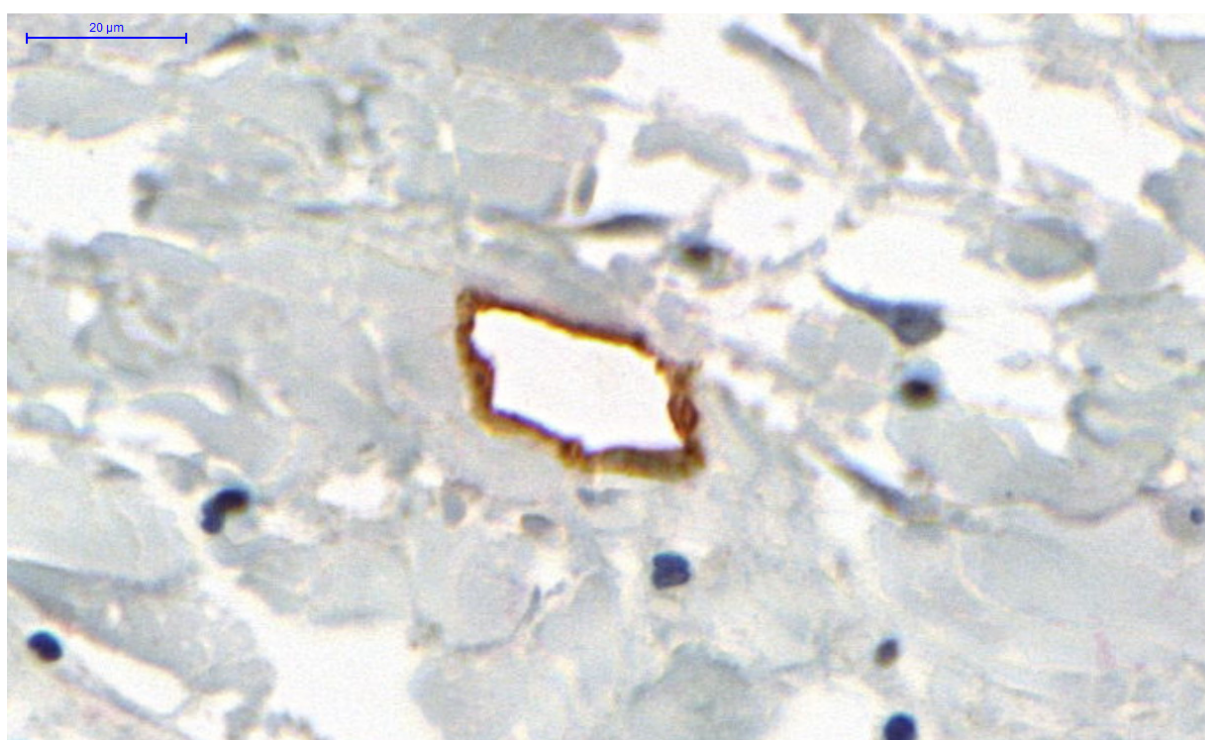


Figura 38. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 no vaso linfático do carcinoma mucoepidermóide (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain).

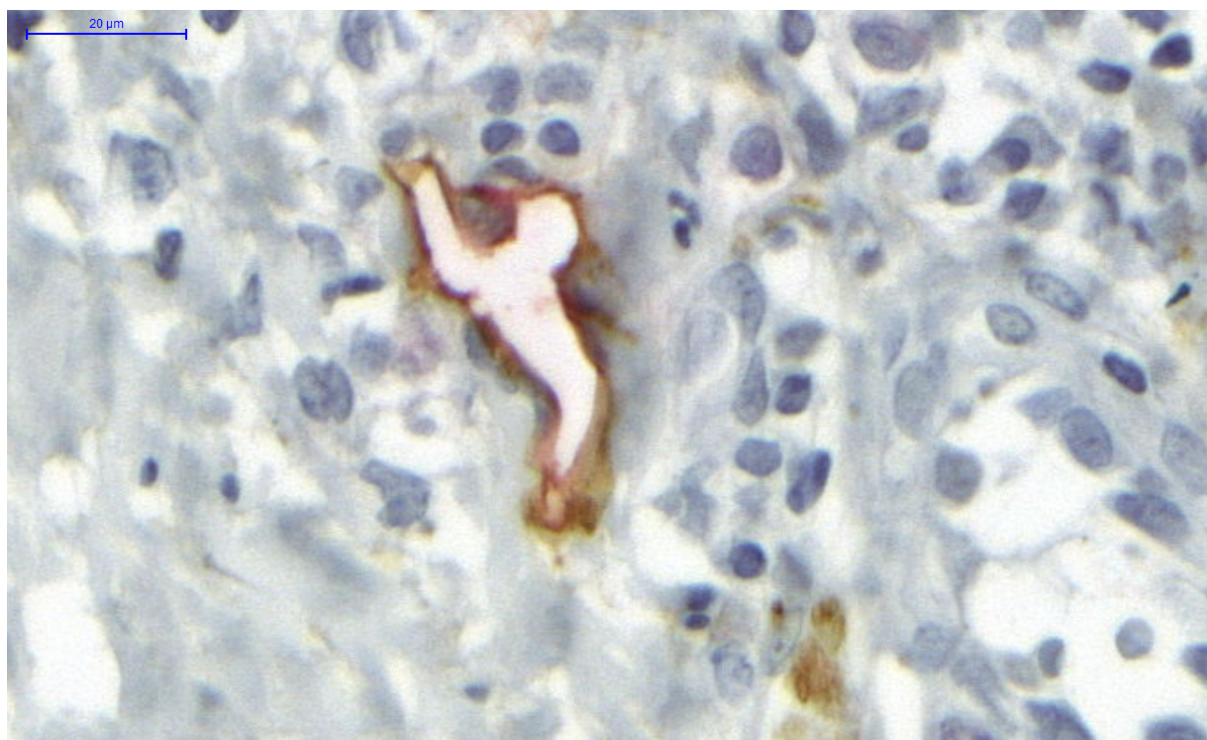


Figura 39. Fotomicrografia evidenciando a dupla marcação pelo D2-40/Ki-67 no vaso linfático do carcinoma adenóide cístico (Pannoramic Viewer, Envision Double Stain).

6 DISCUSSÃO

Os tumores de glândula salivar são lesões relativamente incomuns afetando predominantemente glândulas salivares maiores, especialmente a parótida (ITO et al., 2005; PIRES et al., 2007; ELLIS, AUCLAIR, 2008). Estes tumores são apontados como os responsáveis por um a 4% de todas as neoplasias humanas (TAMPOURIS et al., 2012). Os tumores de glândula salivar menor são lesões ainda mais incomuns e representam 9 a 23% de todos os tumores de glândula salivar. (ITO et al., 2005; PIRES et al., 2007; ELLIS, AUCLAIR, 2008). A maioria das séries de caso reportadas na literatura incluem tanto tumores de glândula salivar maior como de glândula salivar menor, tornando difícil a avaliação real da frequência e o local de maior acometimento das neoplasias de glândula salivar (PIRES et al., 2007).

O adenoma pleomórfico é uma neoplasia benigna de glândula salivar com diferenciação epitelial ductal e mioepitelial, histopatologicamente caracterizada por uma grande diversidade de aspectos morfológicos. Alguns estudos têm demonstrado que o adenoma pleomórfico subtipo II (mixóide) é o mais freqüentemente encontrado, seguido do subtipo III (celular) e do subtipo I (clássico) (SEIFERT et al., 1976; STENNERT et al., 2001; ITO et al., 2009). No presente estudo, dentre os 20 casos de adenomas pleomórficos analisados, foi verificada uma predominância do tipo III, com dez casos (50%), seguido do tipo I, com oito casos (40%) e por dois casos do tipo II (10%). Diferindo do presente estudo, uma análise de 103 casos de adenoma pleomórfico realizada por Mărgăritescu et al. (2005), 55% dos casos foram classificados como do tipo I, seguido pelo tipo II (24%) e em menor proporção, os casos foram incluídos nos tipos III (12%) e IV (9%).

Embora os tipos histopatológicos não apresentem relação com o prognóstico, a classificação proposta por Seifert et al. (1976), enfatiza o amplo espectro morfológico destas neoplasias (MĂRGĂRITESCU et al., 2005).

O carcinoma mucoepidermóide é um dos tumores malignos mais comuns de glândula salivar e apresenta uma grande variabilidade no seu comportamento clínico (GLEBER-NETTO et al., 2012). Este tumor é caracterizado por exibir proporções variadas de células epidermóides, mucosas e intermediárias, podendo ainda exibir células claras, cúbicas, cilíndricas altas e de aspecto oncocítico e geralmente demonstram crescimento cístico proeminente. Cada um dos diversos subtipos histopatológicos tem características patológicas únicas.

No presente estudo, 11 (55%) casos de carcinomas mucoepidermóides foram classificados como de baixo grau de malignidade por exibirem formação de espaços císticos

abundantes, revestidos predominantemente por células mucosas com áreas associadas às células intermediárias. Seis (30%) casos foram classificados como de alto grau de malignidade por exibirem predomínio de células epidermóides além de células mucosas arranjadas em um padrão sólido, com escassas formações císticas. Três (15%) casos foram classificados como de grau intermediário por exibirem menor frequência de formação de espaços císticos associados à células intermediárias e epidermóides. Yamasaki et al. (2014) em estudo com 45 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândula salivar maior e menor encontraram resultados semelhantes com 32 tumores de baixo grau de malignidade, 02 tumores de grau intermediário e 11 de alto grau.

O carcinoma adenóide cístico é um tumor humano relativamente incomum, com uma incidência de 4,5 casos por um milhão de pessoas (MOSKALUK, 2013), embora seja um dos tumores que mais acometem as glândulas salivares. Histopatologicamente, é composto por células epiteliais de aspecto basalóide, com um citoplasma geralmente escasso, que exibem diferenciação epitelial ductal ou mioepitelial, com predomínio da diferenciação mioepitelial.

Nos casos de carcinomas adenóides císticos do presente estudo observou-se o predomínio dos padrões cribriforme e sólido, ambos com 35% (07) dos casos, seguidos pelo padrão tubular com 30% (06) dos casos. Em seu estudo, Da Cruz Peres et al. (2006) ao estudarem 107 casos de carcinomas adenóides císticos, o padrão predominante também foi o cribriforme correspondendo a 54,2% (58) dos casos, mas diferindo na sequência por ser seguido pelo padrão tubular com 25,2% (27) e o padrão sólido com 20,6% (22).

O carcinoma adenóide cístico apresenta tipicamente um crescimento lento e indolente associado a frequentes metástases tardias à distância, estando o padrão/gradação histopatológico associado ao prognóstico das neoplasias de glândula salivar (EL-NAGGAR; HUVOS, 2005; GOODE, EL-NAGGAR, 2005).

Embora seja evidente a importância dos vasos linfáticos na disseminação dos processos neoplásicos malignos, o seu papel ainda não está totalmente esclarecido. Considerando-se que a formação de vasos linfáticos peritumorais, promovida pelo VEGF-C, seja considerado suficiente para a propagação da linfangiogênese tumoral, a função dos vasos linfáticos intratumorais no processo continua sendo uma questão em debate (SALZMAN et al., 2014). Células de glândula salivar normal são capazes de produzir e secretar VEGF, seja em condições normais ou durante o desenvolvimento de neoplasias, mas há poucos estudos a respeito desta propriedade em neoplasias de glândulas salivares (TAMPOURIS et al., 2012). Sendo assim, o atual conhecimento da expressão de VEGF-C e VEGF-D e da densidade endotelial linfática em tumores benignos e malignos de glândula salivar ainda é muito incipiente.

A proliferação de novos vasos linfáticos é mediada por múltiplos fatores de crescimento, dentre eles pode-se destacar o VEGF-C e VEGF-D (SALZMAN et al., 2014). Existem evidências experimentais de que a expressão destes dois fatores por células tumorais malignas estimula a proliferação de células endoteliais linfáticas e promove a invasão linfática e a metástase linfonodal (MATTILA et al., 2002; PEPPER et al., 2003; SKOBE et al., 2001; SALZMAN et al., 2014). Em neoplasias salivares, informações sobre a expressão do VEGF-C e VEGF-D são limitadas. Contudo, dois estudos suportam a associação entre a expressão destas proteínas e metástases linfonodais de carcinomas salivares (MELLO et al., 2011; FUJITA et al., 2011) não sendo encontrado, na literatura por nós consultada no PUBMED até 15 de fevereiro de 2014, nenhum estudo em tumores benignos de glândula salivar.

Na presente pesquisa, procurou-se verificar a expressão imuno-histoquímica de VEGF-C e VEGF-D tanto em região peritumoral como intratumoral nos tumores pesquisados. Para isto, foram estabelecidos escores de expressão, baseados no percentual de células imunomarcadas. Os resultados do presente estudo demonstraram que considerando os escores de expressão de VEGF-C em região peritumoral e intratumoral a maioria dos adenomas pleomórficos revelou mais de 50% das células imunomarcadas e de forma similar, os carcinomas mucoepidermóides e os carcinomas adenóides císticos. Considerando os escores de expressão de VEGF-D em região peritumoral como intratumoral, a maioria dos adenomas pleomórficos, carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos exibiram menos de 50% das suas células imunomarcadas. Estes dados estão parcialmente de acordo com os descritos no estudo de Fujita et al. (2011) que demonstraram expressão de VEGF-C em carcinomas adenóides císticos mas, não evidenciaram expressão de VEGF-D nestes tumores.

O grupo das glândulas salivares normais exibiu forte expressão para o VEGF-C nas células acinares e nas células ductais enquanto que o VEGF-D mostrou-se fracamente expresso nas células ductais em dois casos desse grupo e os demais casos apresentaram-se negativos. Esses achados sugerem que as células acinares e as células ductais produziram VEGF-C, enquanto que apenas as células dos ductos salivares apresentaram fraca expressão para VEGF-D. Esses achados estão de acordo com os encontrados por Fujita et al. (2011) no qual as glândulas salivares expressaram altos níveis de VEGF-C e baixos níveis de VEGF-D.

Gleber-Netto et al. (2012), ao avaliar angiogênese e linfangiogênese em carcinomas mucoepidermóides, verificaram positividade para VEGF-C nestes tumores, sendo esta expressão frequentemente observada no parênquima tumoral e em células inflamatórias. Em outro estudo com 75 casos de carcinoma de mama realizado por Williams et al. (2003) os

autores evidenciaram que aqueles tumores que não demonstraram linfangiogênese foram altamente positivos para o VEGF-C.

Quando foi realizada a análise da expressão de VEGF-C em relação as gradações histopatológicas de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides esta não revelou diferença significativa entre a expressão de VEGF-C peritumoral e intratumoral e a gradação histopatológica de malignidade destas lesões. De maneira semelhante, também não revelou diferença significativa entre os padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos em relação a expressão de VEGF-C peritumoral, contudo exibiu diferença significativa em relação a expressão de VEGF-C intratumoral entre os carcinomas adenóides císticos do padrão cribriforme e sólido.

A análise da expressão de VEGF-D em relação a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides e os padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos não demonstrou diferença significativa entre a gradação histopatológica de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides em relação a expressão de VEGF-D peritumoral e intratumoral. Na análise dos carcinomas adenóides císticos, também não foi evidenciada diferença significativa entre os padrões histopatológicos em relação a expressão de VEGF-D peritumoral e intratumoral.

De modo geral, em tumores humanos, a densidade vascular linfática tem sido analisada no interior da massa neoplásica principal (vasos linfáticos intratumorais) bem como nas margens do tumor (vasos linfáticos peritumorais). Apesar de ser proposto que os vasos linfáticos intratumorais sejam não-funcionais no modelo tumoral, estes estão associados com um resultado clínico adverso e metástase linfonodal em certos tipos de tumores humanos, tais como o melanoma de pele, o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e de colo uterino (GOMBOS et al., 2005; KYZAS et al., 2005; SOARES et al., 2007). Contudo, em outros tipos de neoplasias, como os cânceres de mama, ovário, endométrio e pulmão não foi evidenciada uma rede linfática intratumoral (SCHOPPMANN et al., 2002; WILIAMS et al., 2003; GOMBOS et al., 2005; KOUKOURAKIS et al., 2005; SOARES et al., 2007).

No presente estudo, ao se avaliar a densidade linfática peritumoral em neoplasias de glândula salivar e glândula salivar normal, foi verificada uma maior densidade de vasos linfáticos imunomarcados pelo anticorpo D2-40 no grupo dos carcinomas adenóides císticos, seguido pelo grupo dos carcinomas mucoepidermóides e dos adenomas pleomórficos sendo estes resultados estatisticamente significativos. Na avaliação da densidade linfática intratumoral e da densidade linfática total também foi evidenciada maior densidade de vasos linfáticos imunomarcados pelo anticorpo D2-40 no grupo dos carcinomas adenóides císticos,

seguido pelo grupo dos carcinomas mucoepidermóides e dos adenomas pleomórficos. Considerando a capacidade limitada para metástases linfonodais dos carcinomas adenóides císticos, conforme evidenciada na prática clínica, os resultados do presente estudo diferem de estudos anteriormente realizados, tendo em vista que neste grupo de tumores foi evidenciada maior densidade endotelial linfática quando comparados com os demais grupos do estudo.

O grupo dos adenomas pleomórficos exibiu densidade linfática peritumoral, intratumoral e total menores do que os demais grupos de tumores estudados e também do grupo das glândulas salivares normais sendo estes resultados estatisticamente significativos. Os dados observados no presente estudo concordam com os verificados por Swelan et al (2005) que sugeriram que esses achados podem ser atribuídos ao fato do adenoma pleomórfico ser caracterizado por um estroma pobremente vascularizado seja ele do tipo hialino, mixóide ou condróide.

Os resultados do presente estudo demonstraram um gradiente crescente da densidade linfática peritumoral, intratumoral e total, com valores menores para o grupo dos adenomas pleomórficos e maiores nos carcinomas adenóides císticos, sugerindo que a densidade linfática estaria intimamente relacionada ao comportamento biológico das neoplasias de glândula salivar, apresentando níveis menores em tumores benignos e maiores nos tumores malignos.

De forma análoga, no estudo de Soares et al. (2007), ao avaliarem a densidade vascular linfática e a linfangiogênese em dez casos de adenomas pleomórficos e 16 casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos através da imuno-histoquímica para o D2-40 os autores observaram que os adenomas pleomórficos e os carcinoma ex-adenomas pleomórficos apresentaram raros ou nenhum vaso linfático intratumoral. Contudo, nem a densidade linfática peritumoral nem a densidade linfática intratumoral aumentou em comparação ao tecido de glândula salivar adjacente ao tumor, exibindo distribuição e morfologia dos vasos linfáticos com uma aparência similar ao encontrado em glândulas salivares normais.

Fujita et al. (2011) ao avaliar 29 casos de carcinomas adenóides císticos e 10 casos de glândula salivar normal, utilizando o D2-40 para identificação dos vasos linfáticos, verificaram positividade desses vasos linfáticos no grupo dos carcinomas adenóides císticos, embora esses vasos fossem pequenos e, muitas vezes, restritos a periferia do tumor. A densidade linfática encontrada para essa lesão não foi maior que a encontrada nas glândulas salivares normais, sendo sugerido por esses autores que a linfangiogênese não ocorreria nesses tumores. Na presente pesquisa os achados foram discordantes dos evidenciados pelo estudo ora citado.

Ao avaliar a relação entre densidade linfática tumoral e as gradações/padrões histopatológicos exibidas pelos tumores constantes do presente estudo, no grupo dos

carcinomas mucoepidermóides foi verificada maior densidade linfática entre os tumores de grau intermediário, seguido pelos de baixo e alto grau. A análise da relação entre a densidade linfática tumoral e os padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos revelou maior densidade linfática tumoral entre os tumores do padrão tubular, seguido pelos padrões sólido e cribriforme.

A formação de novos vasos linfáticos (linfangiogênese) ocorre tanto no desenvolvimento normal dos tecidos como em processos patológicos (DA et al., 2008). Vasos linfáticos neoformados são considerados essenciais para a disseminação do tumor, tendo em vista que os linfonodos são os sítios principais de acometimento de metástases nos cânceres da região da cabeça e pescoço. O desenvolvimento de novos estudos para avaliar a condição de linfangiogênese em tumores humanos aumenta as possibilidades de compreensão de variações patológicas no câncer (GLEBER-NETTO et al., 2012).

Para isto, no presente estudo foi verificada a proliferação endotelial linfática das neoplasias constantes do estudo e das glândulas salivares normais a partir de células endoteliais linfáticas duplamente marcadas para os anticorpos D2-40 e Ki-67. O grupo dos carcinomas adenóides císticos exibiu os maiores níveis de proliferação endotelial e o grupo dos carcinomas mucoepidermóides exibiu níveis próximos enquanto que o grupo dos adenomas pleomórficos, seguido das glândulas salivares normais exibiram os níveis mais baixos de proliferação endotelial linfática.

Considerando este aspecto, alguns estudos relatados na literatura têm focado esta propriedade das neoplasias. Soares et al. (2007) avaliando a proliferação linfática em dez casos de adenomas pleomórficos e 16 casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos, através da dupla marcação empregando os anticorpos D2-40/Ki-67, verificaram a presença de raros vasos linfáticos em apenas um dos casos de adenoma pleomórfico estudados. Entre os casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos iniciais (minimamente invasivos) apenas em dois dos oito casos estudados foi possível observar raros e pequenos vasos linfáticos intratumorais, não sendo encontrados vasos linfáticos intratumorais proliferantes. Resultados similares foram encontrados em câncer de mama no estudo realizado por Williams et al. (2003) com 76 carcinomas de mama invasivos cujos achados suportam a hipótese de que tumores de mama disseminam por invasão de vasos linfáticos peritumorais pré-existent em vez de linfangiogênese. Esses achados corroboram com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Também, foi avaliada a relação entre a proliferação endotelial linfática e as gradações/padrões histopatológicos presentes nas lesões estudadas, sendo evidenciado que nos casos de

adenomas pleomórficos ocorreu maior proliferação endotelial linfática entre os tumores do subtipo mixóide, seguido dos subtipos clássico e celular. Nos casos de carcinomas mucoepidermóides, foi verificada uma maior proliferação endotelial linfática entre os tumores de baixo grau, seguido pelos de grau intermediário e os de alto grau. A análise da relação entre a proliferação endotelial linfática e os padrões histopatológicos dos carcinomas adenóides císticos revelou maior proliferação endotelial linfática entre os tumores do padrão tubular, seguido pelos padrões cribriforme e sólido.

Foram analisadas possíveis correlações entre a densidade linfática e os escores de expressão do VEGF-C e VEGF-D, não sendo constatadas correlações significativas em todos os grupos estudados. Entretanto, ao avaliar a densidade linfática intratumoral em adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermóides, foi evidenciada tendência a uma correlação inversamente proporcional entre a densidade linfática intratumoral e a expressão de VEGF-C bem como uma tendência a uma correlação inversamente proporcional entre a densidade linfática peritumoral e a expressão de VEGF-D uma vez que o coeficiente de correlação de Spearman revelou valores negativos. Os resultados, anteriormente citados, diferem dos obtidos por Mello et al. (2011) que demonstraram existir relação entre a expressão de VEGF-C e densidade linfática tumoral ou metástase nodal em 65 casos de carcinomas salivares de tipos histopatológicos variados.

Tampouris et al. (2012) avaliaram a expressão de VEGF-C, VEGF-D e flt-4 em 31 casos de neoplasias de glândula salivar evidenciando positividade variada para o VEGF-C entre os casos de adenomas pleomórficos, mioepiteliomas, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides, e verificaram negatividade para essa proteína nos casos de adenomas de células basais e tumor de Warthin. Com relação a expressão para o VEGF-D esta foi fortemente expressa em todas as lesões estudadas.

Salzman et al. (2014), em estudo com 20 casos de adenomas pleomórficos (6 não recorrentes; 4 recorrentes primários e 10 recorrentes), verificaram expressão de VEGF-C e VEGF-D e densidade linfática nesses tumores evidenciando que todos os casos exibiram elevada positividade para o VEGF-C, com níveis mais altos do que os expressos pelas células ductais da glândula salivar normal. Contudo, apresentaram baixo número de vasos linfáticos tumorais em todos os casos.

Resultados discrepantes entre a expressão de VEGF-C e densidade linfática têm sido relatados. Em estudo realizado por Leu et al. (2000) em sarcomas murinos, os autores atribuíram à ausência de correlação entre densidade linfática e expressão do VEGFR-3, VEGFR-2 e VEGF-C a um possível colapso vascular devido ao aumento da pressão intersticial

devido ao crescimento das células tumorais, empurrando os vasos linfáticos para a periferia do tumor. Soares et al. (2007) sugeriram efeito análogo ao citado por Leu et al. (2000) ao estudar adenomas pleomórficos quando estes apresentam abundante estroma mixocondróide. Essas condições poderiam explicar as diferenças encontradas entre a densidade linfática peritumoral e intratumoral nos casos avaliados no presente estudo.

Possíveis correlações entre a proliferação endotelial linfática e os escores de expressão do VEGF-C e VEGF-D também foram analisadas neste estudo não sendo constatadas correlações significativas entre a proliferação endotelial linfática e a expressão do VEGF-C e VEGF-D para todos os grupos de tumores. Entretanto, ao ser avaliada a proliferação endotelial linfática e a expressão do VEGF-C em adenomas pleomórficos e carcinomas adenóides císticos foi evidenciada uma tendência de correlação inversamente proporcional entre a proliferação endotelial linfática e a expressão de VEGF-C tanto em região peritumoral como em região intratumoral uma vez que o coeficiente de correlação de Spearman revelou valores negativos. Na avaliação da correlação entre proliferação endotelial linfática e expressão do VEGF-D também foi evidenciada uma tendência de correlação inversamente proporcional entre a proliferação endotelial linfática e a expressão de VEGF-D em região peritumoral dos adenomas plemórficos e em região intratumoral de carcinomas adenóides císticos uma vez que o coeficiente de correlação de Spearman revelou valores negativos.

Destacamos que de acordo com os resultados do presente estudo, embora não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa para a densidade endotelial linfática, foi possível observar maiores valores para as neoplasias malignas e menores para a neoplasia benigna. De maneira semelhante, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para a proliferação endotelial linfática contudo, esta foi observada em todos os grupos estudados.

Diante dos achados é possível ainda sugerir que a forte expressão do VEGF-C nas células tumorais indicam que esta proteína, envolvida no processo da linfangiogênese tumoral, pode desempenhar um papel importante no processo de estimulação na formação de novos vasos linfáticos em neoplasias de glândulas salivares. Além disso, a fraca expressão de VEGF-D e a sua ausência na maioria dos casos estudados, sugerem que esta proteína pode não ter participação no processo de linfangiogênese tumoral em neoplasias de glândulas salivares.

Diante do resultados da presente pesquisa, reafirma-se a necessidade de continuidade na investigação de outros fatores envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão das neoplasias de glândula salivar, principalmente fatores envolvidos no processo da linfangiogênese em carcinomas adenóides císticos que exibiram neste estudo uma elevada

proliferação de vasos linfáticos, para melhor compreender o comportamento biológico destas neoplasias.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Todos os casos estudados exibiram forte expressão positiva para VEGF-C em região peritumoral e intratumoral, não sendo evidenciada diferenças de imunoexpressão entre os grupos. Esta forte expressão do VEGF-C nas células tumorais podem indicar que esta proteína, envolvida no processo de linfangiogênese tumoral, desempenha papel importante na estimulação para formação de novos vasos linfáticos em neoplasias de glândula salivar.
2. Foi observada diferença significativa entre os padrões histológicos e a imunoexpressão de VEGF-C no grupo dos carcinomas adenóides císticos, nos padrões cribriforme e sólido, não sendo evidenciada diferenças significativas nos demais padrões/gradações histológicas das lesões estudadas.
3. Na maioria dos casos, observou-se fraca marcação para VEGF-D tanto em região peritumoral como intratumoral, não sendo evidenciada diferenças de imunoexpressão entre os grupos. Estes achados sugerem que esta proteína não tem participação ou está inibida no processo de linfangiogênese em neoplasias de glândula salivar.
4. Foi observada diferença significativa entre os padrões/gradações histológicas e a imunoexpressão de VEGF-D em região intratumoral, onde o grupo dos carcinomas mucoepidermóides apresentaram maior imunorreatividade e o grupo dos carcinomas adenóides císticos, a menor.
5. A densidade endotelial linfática peritumoral, intratumoral e total dos grupos estudados revelaram gradiente de densidade crescente, no qual os adenomas pleomórficos tiveram menores valores, seguido pelos carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos.
6. Foi constatada proliferação endotelial linfática em todos os grupos estudados não sendo evidenciada diferença entre eles.

7. Quando correlacionada a densidade endotelial linfática peritumoral, intratumoral e total com o padrão/gradação histológica das lesões, foi verificada diferença significativa no grupo dos carcinomas adenóides císticos, sendo o padrão tubular o que exibiu maior imunorreatividade enquanto o padrão cribriforme, a menor.
8. Não foram evidenciadas correlações entre a imunoexpressão para o VEGF-C e VEGF-D em relação a densidade linfática tumoral, como também em relação a proliferação endotelial linfática nos grupos estudados.

REFERÊNCIAS

- ACHEN, M. G.; MCCOLL, B. K.; STACKER, S. A. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. **Cancer Cell**. v.7, n.2, p. 121-7, 2005.
- ADAMS, R.H.; ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.8, p.464-78, 2007.
- ALBRECHT, I.; CHRISTOFORI G. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. **Int J Dev Biol**. v.55, p.483-94, 2011.
- ALITALO, K.; CARMELIET P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. **Cancer Cell**. v. 1, p. 219-7, 2002.
- ALITALO, K.; MOHLA, S.; RUOSLAHTI, E. Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. **Cancer Res**. v.64, p. 9225-9, 2004.
- AL-KHATEEB, T.H; ABABNEH, K.T. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**. v.103, p.e53-e9, 2007.
- ALVES, F. A.; PIRES, F. R.; DE ALMEIDA, O. P.; LOPES, M. A.; KOWALSKI, L. P. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.33, p. 593-7, 2004.
- ARIGAMI, T. et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. **Br. J. Cancer**. v.93, p.688-93, 2005.
- AUCLAIR, P.L.; GOODE, R.K.; ELLIS, G.L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer**. v.69, p.2021-30, 2008.
- AUCLAIR, P.L.; ELLIS, G.L. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. **Mod. Pathol.**, v.9, p.652-7, 1996.
- BAI et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. **Head Neck Pathol**. v.7, n.p.105-12, 2013.
- BALUK, P. et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. **J Exp Med**. v.204, p.2349-62, 2007.
- BARNES, L. et al. (Eds) **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.
- BEASLEY, N. J.; PREVO, R.; BANERJI, S. et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. **Cancer Res**. v.65, n.2, p.1315-20, 2002.
- BIANCHI, B. et al. Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary gland. **Oral Oncol.**, v.44, p.1026-31, 2008.

BRADLEY, P. J. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.** v.12, p.127-32, 2004.

BREITENEDER-GELEFF, S.; SOLEIMAN, A.; HORVAT, R.; AMANN, G.; KOWALSKI, H.; KERJASCHKI, D. Podoplanin – a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. **Verh Dtsch Ges Pathol.** v.83, p.270-75, 1999.

BUCHNER, A.; MERRELL, P. W.; CARPENTER, W. M. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. **J Oral Pathol Med.** v.36, p. 207-14, 2007.

BUTLER, M. G.; ISOGAI, S.; WEINSTEIN, B. M. Lymphatic development. **Birth Defects Res C Embryo Today.** v.87, p.222-31, 2009.

BYRNE, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J. Cell. Mol. Med.,** v.9, p.777-94, 2005.

CAO, R. et al. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. **Cancer Cell** v.6, p.333–45, 2004.

CHANG, L. K.; GARCIA-CARDEÑA, G.; FARNEBO, F. et al. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.101, n.32, p.11.658-11.663, 2004.

CHOI, W.W. et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF family gene expression. **Mod. Pathol.** v.18, p.143-52, 2005.

COPELLI, C. et al. Malignant tumors of intraoral minor salivary glands. **Oral Oncol.,** v.44, p.658-63, 2008.

DA CRUZ PEREZ, D.E. et al. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol.,** v.42, p.139-46, 2006.

DA, M.X.; WU, Z.; TIAN, H.W. Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. **Arch Med Res.** v. 39, n.4, p. 365-72. 2008.

DA SILVEIRA, E.J.; VERAS BARROS, S.S.; DE AMORIM, R. F.; QUEIROZ, L. M.; FREITAS R.de A.; DE SOUZA, L. B. Cytokeratin profile in mucoepidermoid carcinoma is not related to its histological grading of malignancy. **Exp Mol Pathol.** v.81, p. 72-6, 2006.

DADRAS, S.S. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. **Am J Pathol.** v.162, p.1951-60, 2003.

DAS, S.; SKOBE, M. Lymphatic vessel activation in cancer. **Ann N Y Acad Sci.** v.1131, p. 235-41, 2008.

DARDICK, I. **Color atlas/ text of salivary gland pathology.** New York: Igaku-Shoin Medical Publishers, 274p, 1996.

DE AQUINO, A. R. *Imunoexpressão de vegf-c, vegfr-3, hif-1 α e mensuração da densidade linfática em carcinomas epidermóides de lábio inferior metastáticos e não metastáticos: uma relação com parâmetros clinicopatológicos e prognósticos*. 2012. 221f. Tese (Doutorado em Patologia Oral), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2012.

DENG, Y.; KURLAND, B. F.; WANG, J. et al. High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor. **Am J Clin Oncol**. v.32, n.3, p.245-52, 2009.

DE OLIVEIRA, L. C. *Estudo imuno-histoquímico da expressão de GLUT-1 e mensuração do índice anigogênico (CD34) em adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares*. 2012. 109f. Dissertação (Mestrado em Patologia Oral). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 2012.

DWIVEDI N, AGARWAL A, RAJ V, CHANDRA S. Histogenesis of salivary gland neoplasms. **Indian J Cancer**. v.50, n.4, p. 361-366, 2013.

DUMOFF, K. L.; CHU, C. S.; HARRIS, E. E. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. **Mod Pathol**. v.19, p.708-16, 2006.

DUONG, T.; KOOPMAN, P.; FRANCOIS, M. Tumor lymphangiogenesis as a potential therapeutic target. **J Oncol**. 2012.

ELLIS G.L., AUCLAIR P.L. **Tumors of the salivary glands. AFIP Atlas of Tumor Pathology**. 4th series, fascicle 9. Silver Spring MD: ARP Press; 2008.

EL-NAGGAR, H., HUVOS, A. G. Adenoid cystic carcinoma. In Barnes, L. et al. (Eds) **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 221-222.

EVESON, J.W. et al. Tumours of the salivary glands: Introduction. In: Barnes, L. et al. (Eds) **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 212-215.

FARNSWORTH, R. H.; ACHEN, M. G.; STACKER, S. A. Lymphatic endothelium: an important interactive surface for malignant cells. **Pulm Pharmacol Ther**. v.19, n.1, p. 51-60, 2006.

FAUSTINO, S.E.S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymphnode metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.37, p.372-8, 2008.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**. v.9, p.669-76, 2003.

FLAMME, I. et al. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PASdomain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. **Mech Dev**. v.63, p.51-60, 1997.

FOGT, F.; ZIMMERMAN, R. L.; ROSS, H. M.; DALY, T.; GAUSAS, R. E. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. **Oncol Rep.** v.11, p. 47-50, 2004.

FREITAS, V. S. *Estudo da expressão imuno-histoquímica das MMPs -2, -7, -9 e -26 e dos TIMPS -1 e -2 em adenomas pleomórficos e carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares menores.* 2011. 156f. Tese (Doutorado em Patologia Oral), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 2011.

FUJITA, G. et al. Lymphatic vessels and related factors in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **Mod. Pathol.**, v.24, p.885-91, 2011.

GLEBER-NETTO, F. O.; FLORÊNCIO, T. N.; DE SOUSA, S. F.; ABREU, M. H.; MENDONÇA, E. F.; AGUIAR, M. C. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. **J Oral Pathol Med.** v.41, n.8, p.603-609, 2012.

GOMBOS, Z.; XU, X.; CHU, C. S. et al. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor c expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Clin Cancer Res.** n.11, p.8634-8671, 2005.

GOODE, R.K.; EL-NAGGAR, A.K. Mucoepidermoid carcinoma. In: Barnes, L. et al (eds.). **World Health Organization classification of tumours: head and neck tumours.** Lyon: IARCPress, 2005.

HARVEY, N. L.; OLIVER, G. Choose your fate: artery, vein or lymphatic vessel? **Curr Opin Genet Dev.** v.14, p.499-505, 2004.

HIRAKAWA, S.; HONG, Y. K.; HARVEY, N. et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. **Am J Pathol.** v.162, p.575-86, 2003.

HIROTA, K., WAKISAKA, N., SAWADA-KITAMURA, S., KONDO, S., ENDO, K., TSUJI, A., MURONO, S., YOSHIZAKI, T. Lymphangiogenesis in regional lymph nodes predicts nodal recurrence in pathological N0 squamous cell carcinoma of the tongue. **Histopathology.** v.61, n.6, p.1065-1071, 2012.

HOLMES, D. I; ZACHARY, I. C. Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2. **Cell Signal.** v.20, n.3, p.569-579, 2008.

ITO, F.A. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.34, p.533-6, 2005.

ITO, F.A. et al. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal,** v.14, p.E57-E61, 2009.

JABER, M.A. Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.35, p.150-4, 2006.

JACKSON, D. G.; PREVO, R.; CLASPER, S.; BANERJI, S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. **Trends Immunol.** v.22, p. 317-21, 2001.

JAKOBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunol Lett.** v.90, p. 103-22, 2003.

JONES, A.V. et al. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. **Oral Oncol.**, v.44, p.407-17, 2008.

JOUKOV, V. et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. **Embo J.**, v.15, p.1751, 1996.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev** v.82, p.673-700, 2002.

KAHN, H. J.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. **Lab Invest.** v.82, p.1255-7, 2002.

KAIPAINEN, A. et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.3566-70, 1995.

KARKKAINEN, M. J.; ALITALO, K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. **Semin Cell Dev Biol.** v.13, n.1, p.9-18, 2002.

KARPANEN, T.; ALITALO K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. **Annu Rev Pathol.** v.3, p.367-97, 2008.

KARPANEN, T.; EGEBLAD, M.; KARKKAINEN, M. J.; KUBO, H.; YLA-HERTTUALA, S.; JAATTELA, M.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. **Cancer Res.** v.61, n.5, p. 1786-90, 2001.

KATO, S. et al. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. **Anat. Sci. Int.**, v.81, p.71–83, 2006.

KAWAMURA, L. *Avaliação da densidade vascular linfática intratumoral em adenocarcinomas primários de endométrio*. 2011. 96f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

KOCH, M.; DETTORI, D.; VAN NUFFELEN, A. VEGF-D deficiency in mice does not affect embryonic or postnatal lymphangiogenesis but reduces lymphatic metastasis. **J Pathol.** v.219, n.3, p.356-64, 2009.

KOKEMUELLER, H. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck - a 20 years experience. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.33, p.25-31, 2004.

KOUKOURAKIS MI, GIATROMANOLAKI A, SIVRIDIS E et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. **J Clin Pathol.** v.58, n.2, p.202-206, 2005.

KYZAS, P.A. et al. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. **J. Pathol.**, v.206, p.170-7, 2005.

KYZAS, P.A. et al. Dysadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with lymphangiogenesis and prognostic significance. **Am J Surg Pathol.** v.30, p.185-93, 2006.

LEAK, L.V. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. **Fed Proc.** v.35, p.1863-71, 1976.

LEAK, L. V.; BURKE, J. F. Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. **Am J Anat.** v.118, p.785-809, 1966.

LEVIDIOTIS, V.; POWER, D. A. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. **Nephrology (Carlton).** v.10, p.157-66, 2005.

LEU, A. J. et al. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. **Cancer Res.** v.60, p.4324-4327, 2000.

LOHELA, M. et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Cell. Biol.**, v.21, p.154-65, 2009.

MABY-EL HAJJAMI, H.; PETROVA, T. V. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. **Histochem Cell Biol.** v.130, p. 1063-78, 2008.

MANDRIOTA, S. J.; JUSSILA, L.; JELTSCH, M. et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. **EMBO J.** v.20, n.4, p. 672-82, 2001.

VON MARSCHALL, Z.; SCHOLZ, A.; STACKER, S. A. et al. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. **Int J Oncol.** v.27, n.3, p.669-679, 2005.

MĂRGĂRITESCU, C. et al. Tumoral stroma of salivary pleomorphic adenoma – histopathological, histochemical and immunohistochemical study. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v.46, p.211-23, 2005.

MARQUES, Y. M. F. S. *Análise da via da Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.* 2010. 88f. Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

MATTILA, M. M.; RUOHOLA, J. K.; KARPANEN, T. et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. **Int J Cancer.** v.98, n.6, p.946-51, 2002.

MELLO, M.F. et al. Lymphatic vessel density and expressions of lymphangiogenic growth factors in salivary carcinomas. **Neoplasma**, v.58, p.331-6, 2011.

MENDENHALL, W.M. et al. Radiotherapy alone or combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v.26, p.154-62, 2004.

MORINAGA, S.; NAKAJIMA, T.; SHIMOSATO, Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: an immunohistochemical study. **Hum. Pathol.**, v.18, p.1218-26, 1987.

MOSKALUK, C. A. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. **Head Neck Pathol.** v.7, n.1, p.17-22, 2013.

MULLER, Y.A. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.94, 7192-7, 1997.

NELSON, G.M. et al. Differential gene expression of primary cultured lymphatic and blood vascular endothelial cells. **Neoplasia.** v. 9, p.1038-45, 2007.

NEVILLE, B. W. et al. Patologia das glândulas salivares. In: _____. **Patologia oral & maxilofacial.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 11, p. 373-417.

NIKI, T.; IBA, S.; TOKUNOU, M.; YAMADA, T.; MATSUNO, Y.; HIROHASHI, S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. **Clin Cancer Res.** v.6, n.6, p. 2431-9, 2000.

NILSSON, I. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development. **FASEB J.** v.18, p.1507-15, 2004.

OLIVER, G.; ALITALO, K. The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v.21, p.457-83, 2005.

OKADA K, OSAKI M, ARAKI K, ISHIGURO K, ITO H, OHGI S. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinoma. **Anticancer Res.** v.25, p.3003-9, 2005.

ORDONEZ, N. G. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. **Adv Anat Pathol.** v.13, p. 83-8, 2006.

PEPPER, M. S. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? **Clin Cancer Res.** v.7, p.462-8, 2001.

PEPPER, M. S; TILLE, J. C. NISATO, R. SKOBE, M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. **Cell Tissue Res.** v.314, p.167-77, 2003.

PETROVA, T.V.; MAKINEN, T.; MAKELA, T. P. et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. **Embo J.** v.21, p.4593-9, 2002.

PIRES, F.R. et al. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. **Oral Oncol.** v.43, p.463-70, 2007.

PODGRABINSKA, S. et al. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.99, p.16069-74, 2002.

PÖTGENS, A.J. et al. Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. **J Biol Chem.** v.269, 32879-85, 1994.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia bucal: Correlações clínicopatológicas**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 417p.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v.11, p.73-91, 1995.

ROSKOSKI JR, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Crit Rev Oncol Hematol**. v.62, p.179-213, 2007.

SAHARINEN, P.; TAMMELA, T.; KARKKAINEN, M.J.; ALITALO, K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. **Trends Immunol**. v.25, n.7, p.387-95, 2004.

SAHOO, N. K.; RANGAN, M. N.; GADAD, R.D. Pleomorphic adenoma palate: Major tumor in a minor gland. **Ann Maxillofac Surg**. v.3, n.2, p.195-197, 2013.

SALZMAN, R.; STÁREK, I.; KUČEROVÁ, L.; SKÁLOVÁ, A.; HOZA J. Neither expression of VEGF-C/D nor lymph vessel density supports lymphatic invasion as the mechanism responsible for local spread of recurrent salivary pleomorphic adenoma. **Virchows Arch**. v.469, p.29-34, 2014.

SCHACHT, V.; DADRAS, S. S.; JOHNSON, L. A. et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. **Am J Pathol**. v.166, p.913-21, 2005.

SCHIMANSKI, C. C.; SCHLAEGEL, F.; JORDAN, M. et al. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery. **World J Surg**. v.35, p.1010-6, 2011.

SCHMID, K.; BIRNER, P.; GRAVENHORST, V.; END, A.; GELEFF S. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung. **Am J Surg Pathol**. v.29, n.3, p.324-328, 2005.

SCHOPPMANN, S. F.; BIRNER, P.; STOCKL, J. et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. **Am J Pathol**. v.161, n.3, p. 947-56, 2002.

SCHOPPMANN, S.F.; FENZL, A.; SCHINDL, M.; BACHLEITNER-HOFMANN, T.; NAGY, K.; GNANT, M. et al. Hypoxia inducible factor-1 α correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. v.99, p.135-41, 2006.

SCHULTE-MERKER, S.; SABINE, A.; PETROVA, T. V. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. **J Cell Biol**. v.193, p. 607-18, 2011.

SEIFERT, G.; LANGROCK, I.; DONATH, K. A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands. **HNO**. v.24, n.12, p.415-426, 1976.

SIMIANTONAKI, N.; JAYASINGHE, C.; MICHEL-SCHMIDT, R.; PETERS, K.; HERMANN, M.I.; KIRKPATRICK, C.J. Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/ VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines. **Int J Oncol**. v.32, p.585-92, 2008.

SIRIVANICHSUNTORN, P.; KEELAWAT, S.; DANUTHAI, K.; MUTIRANGURA, A.; SUBBALEKHA, K.; KITKUMTHORN, N. LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma. **BMC Clin Pathol.** v.13, p.10, 2013.

SKOBE, M.; HAWIGHORST, T.; JACKSON, D. G. et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nat Med.** v.7, n.2, p.192-8, 2001.

SOARES, A.B.; DE ARAUJO, V. C.; JULIANO, P. B.; ALTEMANI, A. et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. **J. Oral. Pathol. Med.** v.38, p.623-9, 2009.

SOARES, A.B.; PONCHIO, L.; JULIANO, P. B.; DE ARAUJO, V. C.; ALTEMANI, A. et al. Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumour progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. **J. Clin. Pathol.** v.60, p.995-1000, 2007.

SPEIGHT, P.M. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. **Head Neck Pathol.**, v.1, p.55-60, 2007.

SPEIGHT, P.M.; BARRETT, A.W. Salivary gland tumors. **Oral Dis.**, v.8, p.229-40, 2002.

SPIRO, R. H. Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. **Am J Surg.** v.174, n.5, p. 495-8, 1997.

STACKER, S. A.; BALDWIN, M. E.; ACHEN, M. G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. **FASEB J.** v.6, n.9, p.922-34, 2002.

STENNERT, E.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; KLUSSMANN, J. P.; ARNOLD, G. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. **Laryngoscope.** v.111, n.12, p. 2195-2200, 2001.

STACKER, S. A.; CAESAR, C.; BALDWIN, M. E. et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. **Nat Med.** v.7, n.2, p.186-91, 2001.

SUBHASHRAJ, K. Salivary gland tumors: a single institution experience in India. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 46, n. 8, p. 635-638, 2008.

TAE, K.; EL-NAGGAR, A. K.; YOO, E.; FENG, L. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. **Clin Cancer Res.** v.6, n.7, p.2821-2828, 2000.

TAKAHASHI, H., SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci.** v.109, p.227-41, 2005.

TAKAI, Y. A. et al. Myofilament localization and immunoelectron microscopic detection of muscle-specific actin in neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 18, p. 575-591, 1994.

TAMMELA, T.; ALITALO, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. **Cell**. v.140, p.460-76, 2010.

TAMPOURIS, A. I.; KANDILOROS, D.; GIOTAKIS, I.; GAKIOPOULOU, H.; LAZARIS, A. C. The role of the VEGF-C/-D/flt-4 autocrine loop in the pathogenesis of salivary neoplasms. **Pathol Res Pract**. v.208, n.3, p.151-156, 2012.

TANIS, P. J.; NIEWEG, O. E.; VALDES OLMOS, R. A.; KROON, B. B. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. **J Am Coll Surg**. v.192, n.3, p.399-409, 2001.

TERVALA, T.; SUOMINEN, E.; SAARISTO, A. Targeted treatment for lymphedema and lymphatic metastasis. **Ann N Y Acad Sci**. v.1131, p.215-24, 2008.

TINCANI, A. J.; DEL NEGRO, A.; ARAUJO, P. P. et al. Management of salivary gland adenoid cystic carcinoma: institutional experience of a case series. **Sao Paulo Med J**. v.124, n.1, p.26-30, 2006.

TOBLER, N. E.; DETMAR, M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. **J Leukoc Biol**. v.80, n.4, p.691-6, 2006.

TRIAANTAFILLIDOU, K.; DIMITRAKOPOULOS, J.; IORDANIDIS, F.; KOUFOGIANNIS, D. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. **J Oral Maxillofac Surg**. v.64, n.7, p.1114-20, 2006.

VAN DER AUWERA, I.; CAO, Y.; TILLE, J. C. et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. **Br J Cancer**. v.18, p.1611-25, 2006.

VEIKKOLA, T.; KARKKAINEN, M.; CLAEISSON-WELSH, L.; ALITALO, K. et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. **Embo J**. v.20, p.1223-31, 2001.

WANG, D. et al. Intraoral minor salivary gland tumors in a chinese population: a retrospective study on 737 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**. v.104, n.1, p.94-100, 2007.

WANG, Y.; OLIVER, G. Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease. **Genes Dev**. v.24, n.19, p.2115-26, 2010.

WATANABE, S.; KATO, M.; KOTANI, I.; RYOKE, K.; HAYASHI, K. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinomas of lip and oral cavity: A clinicopathological analysis with immunohistochemistry using antibodies to D2-40, VEGF-C and VEGF-D. **Yonago Acta Med**. v.56, p.29-37, 2007.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion **Br J Cancer**. v.9, n.1, p.1-5, 2007.

WIGLE, J.T.; HARVEY, N.; DETMAR, M. et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. **Embo J**. v.21, p.1505-13, 2002.

WILLIAMS, C. S.; LEEK, R. D.; ROBSON, A. M. et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. **J Pathol.** v.200, p.195-206, 2003.

XUAN, M.; FANG, Y.R.; WATO, M.; HATA, S.; TANAKA, A. Immunohistochemical colocalization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med.** v.34, p.334–339, 2005.

YAMAZAKI, K.; OHTA, H.; SHODO, R.; MATSUYAMA, H.; TAKAHASHI, S. Clinicopathological features of mucoepidermoid carcinoma. **J Laryngol Otol.** v.128, n.1, p.91-95, 2014.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Mol Divers.** v.10, n.4, p.515-527, 2006.

YASUOKA, H.; NAKAMURA, Y.; ZUO, H. et al. VEGF-D expression and lymph vessels play an important role for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. **Mod Pathol.** v.18, n.8, p.1127-33, 2005.

ZBÄREN, P.; STAUFFER, E. Pleomorphic adenoma of the parotid gland: histopathologic analysis of the capsular characteristics of 218 tumors. **Head Neck,** v. 29, p.751-757, 2007.

ZHAO, D.; PAN, J.; LI, X.Q.; WANG, X.Y.; TANG, C.; XUAN, M. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. **J Oral Pathol Med.** v.37, p.616–625, 2008.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **J Oral Pathol Med.** v.39, n.4, p.299-305, 2010.

APÊNDICE A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa **“Estudos imuno-histoquímico e Western Blot da expressão de HIF-1alfa, VEGF-C, VEGF-D e mensuração da densidade linfática em neoplasias de glândulas salivares”**, que é coordenada pela **Profa. Dra. Lélia Batista de Souza**. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa procura estudar o processo de vascularização linfática (mecanismo de irrigação dos tecidos do corpo por um tipo de vaso denominado linfático) e a relação deste processo com a formação e evolução de tumores de glândulas salivares, com o intuito de contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico destas neoplasias.

Caso decida aceitar o convite, você não irá passar por nenhum outro procedimento clínico ou cirúrgico uma vez que este material já se encontra guardado no Serviço de Patologia Oral do Curso de Odontologia/UFRN e assim, não haverá qualquer desconforto e sendo assim o risco de sua participação nesse estudo é mínimo. Apenas nos dará a oportunidade de manusear o material já recolhido durante biópsia (retirada cirúrgica de material) realizada previamente em sua pessoa.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Tendo em vista que a pesquisa será desenvolvida com material arquivado, não necessitando de qualquer intervenção em você, não haverá riscos de sua participação nesse estudo.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

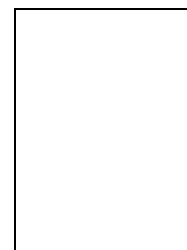
Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Profa. Dra. Lélia Batista de Souza ou Keila Martha Amorim Barroso (Pós-graduanda em Patologia Oral), no Departamento de Odontologia da

UFRN, no endereço Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787, Lagoa Nova, Natal – RN, ou pelo telefone (84) 3215-4132. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, localizado no *Campus* Universitário da UFRN, ou pelo telefone (84) 3215-3135.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, ,
declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa “**Estudos imunohistoquímico e western blot da expressão de HIF-1alfa, VEGF-C, VEGF-D e mensuração da densidade linfática em neoplasias de glândulas salivares**”

Assinatura do Participante



Profa. Dra. Lélia Batista de Souza

Pesquisador Responsável

Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787. Lagoa Nova, Natal/RN. CEP – 59056-000

Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN

Praça do Campus Universitário – Lagoa Nova – Natal/NR

Caixa Postal 1666 CEP 59072-970

Telefone/ Fax: (84) 3215-3135

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICO E WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α , VEGF-C, VEGF-D E MENSURAÇÃO DA DENSIDADE LINFÁTICA EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULA SALIVAR

Pesquisador: LÉLIA BATISTA DE SOUZA

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 05649112.5.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 143.795

Data da Relatoria: 26/10/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto pretende estudar o processo de vascularização linfática e a relação deste processo com a formação e evolução de tumores de glândulas salivares a partir da detecção e quantificação de algumas proteínas envolvidas no desenvolvimento linfático.

Trata-se de um projeto já aprovado pelo CNPq (Edital Universal) que envolve a participação de duas alunas de doutorado, uma delas participa do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN - Bolsista CAPES e a outra do Programa de Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Genética - Instituto de Biociências da USP - Bolsista CAPES. A previsão para execução do projeto é de agosto de 2012 a dezembro de 2013. O estudo consistirá em uma pesquisa retrospectiva caracterizada pela observação, análise, registro e quantificação da expressão das proteínas selecionadas por meio de imuno-histoquímica e Western Blot e da mensuração da densidade linfática, por meio de imuno-histoquímica. A amostra será constituída por 20 casos de adenoma pleomórfico, 20 casos de carcinoma adenóide cístico e 20 casos de carcinoma mucoepidermóide. As amostras estão emblocadas em parafina e serão obtidas obtidos nos arquivos do Serviço de Patologia oral do Curso de Odontologia/UFRN. Serão selecionados 10 casos de material biológico de biópsias que contenham tecido glandular salivar com características de normalidade para efeito comparativo do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é detectar e quantificar, por meio da imuno-histoquímica e Western Blot,

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



as expressões das proteínas HIF-1, VEGF-C e VEGF-D, correlacionando-as com a densidade linfática tumoral, mensurada por meio da imuno-histoquímica, em uma série de casos de adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides comparando-os com espécimes de glândula salivar normal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O desenvolvimento do projeto depende do acesso a material biológico arquivado, e consulta às informações de cada paciente. Os pesquisadores envolvidos garantirão sigilo de todas as informações a que tiverem acesso. Os benefícios deste trabalho superam muito os riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem elaborado, já conta com financiamento aprovado e o cronograma de ações é condizente com as atividades propostas. A metodologia proposta para o desenvolvimento da pesquisa possibilita alcançar o objetivo apresentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A realização do projeto contribuirá para maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos vinculados ao desenvolvimento de metástases nas neoplasias de glândulas salivares. O projeto tem potencial para geração de resultados de grande impacto na área.

Após revisão ética da(s) resposta(s) à(s) pendência(s), levantada(s) no parecer anterior, concluímos que as mesmas foram reparadas adequadamente.

Essa adequação situa o protocolo em questão dentro dos preceitos básicos da ética nas pesquisas que envolvem o ser humano.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em pesquisa (Brasília, 2002) e Res. 196/96 - CNS o pesquisador deve: 1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Res. 196/96 CNS - item IV.2d). Atenção: conforme circular 017/11 - CONEP sobre o TCLE, torna-se obrigatória a rubrica do pesquisador e do participante em

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



todas as páginas assim como a assinatura de ambos na última página;

2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Res. 196/96 - CNS item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP - Brasília - 2002 - p. 41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa (Manual Operacional para Comitês de ética em Pesquisa - CONEP - Brasília - 2002 - p.65).

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

NATAL, 12 de Novembro de 2012

Assinador por:
Dulce Almeida
(Coordenador)

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufnr@reitoria.ufrn.br